

**Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado**



**Péptidos derivados del Receptor de Melanocortina 1 (MC1R) son
eficientemente Reconocidos por linfocitos T citotóxicos en pacientes con
melanoma**

MARCOS IGNACIO RAMÍREZ PALMA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Director de Tesis: Prof. Dr. Flavio Salazar Onfray

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

MARCOS IGNACIO RAMÍREZ PALMA

Ha sido aprobada por la comisión informante como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Mayo

Prof. Dr. Flavio Salazar Onfray

Prof. Dra. María Carme Molina

Prof. Dra. Susan Bueno

Prof. Dra. Marcela Hermoso

Prof. Dr. Juan Honeyman

INDICE

	pág
Resumen	6
Astract	8
Introducción	10
Cánceres cutáneos	10
Melanoma maligno	10
Terapias convencionales para el melanoma	12
Inmunoterapia	14
Recomendaciones internacionales para el manejo del melanoma maligno	16
Inmunoterapia basada en células dendríticas y antígenos asociados a melanoma	17
Bases biológicas de la inmunoterapia.	
Presentación antigénica y activación de Linfocitos T	18
Inducción de tolerancia como efecto adverso	24
Generación de péptidos modificados como técnica para romper la tolerancia	24
MC1R	26
Péptidos derivados de MC1R capaces de inducir CTL específicos in vitro	27
Péptidos modificados derivados de MC1R con mayor afinidad por la molécula MHC-I	27
Hipótesis	29
Objetivos	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
Materiales y métodos	31

Resultados	36
Detección de linfocitos T citotóxicos específicos contra péptidos derivados de MC1R en tejido tumoral (TIL) de pacientes con melanoma.	36
Los tres epítomos derivados de MC1R restringidos para HLA-A2 son reconocidos por TILs	37
Obtención de clones específicos para péptidos de MC1R	40
Estudio de TILs con tetrámeros	43
Inducción de líneas de linfocitos T citotóxicos con los péptidos nativos de MC1R (244, 283 y 291) en sangre donantes normales y de pacientes con melanoma HLA-A*0201	45
Péptidos modificados derivados de MC1R y su capacidad de inducir CTL específicos en donantes normales	51
Conclusiones	54
Discusión	55
Referencias	58
Publicaciones generadas	65
En directa relación con la tesis	65
Otras publicaciones generadas durante el periodo de tesis	65
Anexo 1. Melanocortin 1 Receptor-derived peptides are efficiently recognized by cytotoxic T lymphocytes from melanoma patients	66

RESUMEN

Antecedentes: El melanoma es un tumor maligno derivado de los melanocitos que tiene mal pronóstico cuando se detecta en etapas avanzadas de la enfermedad. Las terapias habituales como la radio y quimioterapia no logran resultados satisfactorios en la mayoría de los pacientes en etapas avanzadas. La inmunoterapia ha surgido en los últimos años como una promisoriosa estrategia para frenar el crecimiento e incluso erradicar tumores metastásicos. Mientras mejor se comprenda la biología tumoral, se pueden perfeccionar cada vez más las actuales técnicas de inmunoterapia. Es por ello que la identificación de antígenos asociados a tumores resulta ser inmensamente trascendente.

El receptor de melanocortina 1 (MC1R) es el ligando natural de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) y de la adrenocorticotropina (ACTH). Es un receptor acoplado a proteína G implicado en la pigmentación, crecimiento celular, homeostasis, inflamación, esteroidogénesis y control de la temperatura. Se expresa principalmente en melanocitos, y en menor grado en la glándula suprarrenal, pero también se encuentra presente en la mayoría de las biopsias de melanoma y líneas celulares derivadas de melanoma, lo que lo transforma en un candidato atractivo como antígeno tumoral.

Previamente en nuestro laboratorio demostramos que tres péptidos hidrófobos derivados de MC1R y de afinidad intermedia por la molécula MHC clase I HLA-A2 (MC1R₂₉₁₋₂₉₈, MC1R₂₄₄₋₂₅₂ y MC1R₂₈₃₋₂₉₁) pueden inducir una respuesta específica de linfocitos T citotóxicos (CTL) a partir de linfocitos de sangre periférica de donantes normales (PBL). Por otra parte, estos CTL específicos para péptidos derivados de MC1R reconocen un panel de melanomas HLA-A2+, lo que demuestra que en humanos, algunas líneas celulares de melanoma presentan naturalmente epítomos de MC1R. Sin embargo, la presencia natural de células T específicas para MC1R en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y en sangre de pacientes con melanoma sigue siendo desconocida, así como también no se ha estudiado el efecto que tiene el aumentar la afinidad de los péptidos derivados de MC1R por el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) en cuanto a la generación de una respuesta *in vitro* específica, es decir, para probar si este aumento de la afinidad facilita la generación de linfocitos específicos que puedan reconocer también el péptido nativo que es expresado naturalmente por melanomas.

Métodos: Se evaluó la presencia de linfocitos TCD8+ específicos anti-MC1R en una población de linfocitos T derivados de PBL y de TIL de pacientes con melanoma HLA-A2+. Luego se crearon péptidos modificados derivados del péptido MC1R₂₉₁₋₂₉₈ (MC1R291) con afinidad aumentada por la molécula MHC clase I, y se utilizaron para inducir linfocitos de donantes normales a partir de PBL,

Resultados: Se indujeron linfocitos específicos para los tres péptidos nativos derivados de MC1R que fueron capaces de lisar melanomas alogénicos HLA-A2+ MC1R+, a partir de PBL de pacientes, lo que demuestra la existencia de un repertorio de células T anti-MC1R en pacientes con melanoma. Por otra parte, los TILs también evidencian actividad anti-MC1R y contra líneas celulares de melanoma. Además, se aislaron clones de linfocitos T CD8+ específicos para el péptido MC1R₂₄₄₋₂₅₂ (MC1R244) de células derivadas de TIL y se identificó un subconjunto de

células específicas para MC1R291 utilizando tetrámeros. Al utilizar los péptidos modificados de MC1R291, obtuvimos que para algunos donantes funciona mejor utilizar alguno de los péptidos modificados que el péptido nativo de MC1R, mientras que en otros donantes funciona mejor el péptido nativo.

Conclusión: En este trabajo se demuestra que los péptidos derivados de MC1R son epítomos inmunogénicos que naturalmente son reconocidos por TILs específicos para melanoma y que son capaces de inducir CTL *in vitro*, por lo tanto pueden ser útiles para el desarrollo de nuevas técnicas de inmunoterapia anti-melanoma. Asimismo el aumento de la afinidad de un péptido por la molécula MHC-I no siempre se traduce en un aumento sustancial de la capacidad inmunogénica de dicho péptido. El efecto de aumentar la afinidad del péptido nativo de MC1R291, no logra un efecto constante ni funciona igual para todos los donantes. Sin embargo, observamos que al menos alguno de los péptidos modificados funciona para la mayoría de los donantes estudiados, y demostramos que se puede inducir actividad anti-MC1R utilizando péptidos modificados, en donantes en los que en una primera instancia el péptido nativo no funcionó, lo cual mejora sustancialmente el rendimiento en cuanto a la generación de linfocitos específicos para un péptido.

Abstract

BACKGROUND: Melanoma is a malignant tumor derived from melanocytes that has a poor prognosis when is detected at advanced stages of the disease. The usual therapies such as radiotherapy and chemotherapy fail to obtain satisfactory results in the majority of patients in advanced stages. Immunotherapy has emerged in recent years as a promising strategy to slow the growth or even eradicate metastatic tumors. The better understanding of the tumor biology, can increasingly improve current techniques of immunotherapy. This is why the identification of tumor-associated antigens seems to be immensely important .

Melanocortin receptor 1 (MC1R) is the natural ligand of the melanocyte stimulating hormone (MSH) and ACTH. It is a G-protein coupled receptor involved in pigmentation cell growth, homeostasis, inflammation, steroidogenesis and temperature control. Is expressed primarily in melanocytes, and to a lesser extent in the adrenal gland but is also present in most melanoma biopsies and cell lines derived from melanoma, which transforms MC1R into an attractive candidate as a tumor antigen.

We previously demonstrated that three hydrophobic low and intermediate-affinity HLA-A2-restricted MC1R derived peptides: MC1R₂₉₁₋₂₉₈, MC1R₂₄₄₋₂₅₂ and MC1R₂₈₃₋₂₉₁, can induce specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) lymphocytes from peripheral blood of normal donors (PBL). Moreover, these MC1R specific CTL recognize a panel of HLA- A2+ melanomas, demonstrating that in humans, melanoma cell lines naturally present MC1R epitopes. However, the natural presence of MC1R-specific T cells in melanoma patient's tumour and blood remains unknown. As well, the effect of increasing the affinity of MC1R derived peptides for the major histocompatibility complex class I (MHC-I), has not been studied in concerning to the generation of a specific *in vitro* response, that is, to test whether this increased affinity facilitates the generation of specific lymphocytes that can also recognize the native peptide which is naturally expressed in melanomas.

METHODS: The presence of anti-MC1R specific CD8+ T cells was established in a population of melanoma-specific T cells derived PBL and tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from HLA-A2+ melanoma patients. Then, we synthesize modified MC1R₂₉₁₋₂₉₈ (MC1R291) derived peptides with increasing affinity for the MHC-I molecule, and were used to induce lymphocytes from normal donor PBL.

RESULTS: CTLs specific for the three MC1R-derived peptides that lysed allogeneic HLA-A2+MC1R+ melanomas were elicited from PBMC, demonstrating the existence of an anti-MC1R T cell repertoire in melanoma patients. Moreover, TILs also recognized MC1R epitopes and HLA-A2+ melanoma cell lines. Finally, HLA-A2/MC1R244-specific CD8+ T cell clones derived from TILs and a subset of MC1R291 specific T cells were identified using HLA-A2/MC1R tetramers. By using the modified MC1R291 derived peptides, we note that for some donors the modified peptides work better than the native MC1R peptide, while in other donors the native peptide works better.

CONCLUSION: Our results demonstrate that MC1R-derived peptides are common immunogenic epitopes for melanoma-specific CTLs and TILs, and may thus be useful for the development of anti-

melanoma immunotherapy. The increase in the affinity of a peptide for the MHC molecule does not result always in a substantial immunogenicity increase of this peptide. The effect of increasing the affinity of the native MC1R291 peptide does not achieve a constant effect and works the same for all donors. However, we note that at least one of the peptides works for almost all donors studied, and we show that anti-MC1R activity can be induced using modified peptides in donors in which in the first instance the native peptide did not work, which substantially improves performance in the generation of lymphocytes specific for a peptide.

INTRODUCCIÓN

Cánceres cutáneos

Así como ocurre con otros órganos, en la piel también se pueden originar patologías como el cáncer. El Carcinoma espinocelular y el carcinoma basocelular son los cánceres más frecuentes en el ser humano y su incidencia aumenta con la edad. También se pueden encontrar metástasis o extensiones de otro tipo de tumores, por ejemplo cuando en el cáncer de mama se observan modificaciones cutáneas. Los linfomas cutáneos como la micosis fungoide (tipo de linfoma No-Hodgkin), el sarcoma de Kaposi, el dermatofibrosarcoma o histiosarcoma maligno y el carcinoma de Merkel son otros ejemplos de tumores cutáneos.

Melanoma maligno

El melanoma es el tumor más agresivo de la piel, a pesar de corresponder tan sólo a un 2-7% de los tumores cutáneos, da cuenta de un 65% de las muertes por cáncer de piel. Es un tumor maligno de origen neuroectodérmico derivado de los melanocitos. Se trata de un tumor generalmente cutáneo, pero también se puede originar en el epitelio pigmentario de la retina e incluso en el intestino. Los principales factores de riesgo para desarrollar melanoma, son la exposición a la luz ultravioleta (UVA y UVB), y la carga genética del individuo. Otros factores de riesgo lo constituyen el número de lunares en un individuo, estar en edad media de la vida, vivir en una región cercana al ecuador, etc.

La historia natural de la enfermedad incluye el crecimiento local del tumor, producción de metástasis en primera instancia por vía linfática y luego por vía hemática que originan la diseminación de la enfermedad, y finalmente la muerte del paciente.

El pronóstico está en relación directa con la precocidad del diagnóstico y la eficacia del tratamiento. Los factores pronósticos más importantes son el índice de Breslow, que corresponde al espesor del tumor, siendo peor el pronóstico a mayor espesor. Se calcula midiendo la distancia en milímetros desde la capa granulosa hasta la zona más profunda de infiltración neoplásica de la dermis. El pronóstico también empeora al aumentar el índice de Clark, que se clasifica del I al V y da cuenta del grado de penetración del tumor en las capas cutáneas, pero no logra tanta precisión como el índice de Breslow. El otro factor pronóstico importante es el grado de afectación ganglionar del tumor.

De la conjunción de estos factores pronósticos se obtiene el estadiaje del tumor basado en la clasificación TNM, que no solo tiene un valor pronóstico más certero, sino que además determina el consiguiente manejo de la patología. El estadiaje del melanoma se basa en una revisión a la antigua clasificación que existía hasta entonces, realizada el año 2001 por la American Joint Comitee on Cancer Staging y sometida nuevamente a revisión el año 2009 (Balch y cols., 2009). Se considera el índice de Breslow de 1, 2 y 4mm como límites, la presencia de ulceración o no, la tipificación adecuada de la afectación ganglionar y la presencia de LDH elevada. Con esto se logró una mejor relación con la sobrevida que con la clasificación anterior (Tabla 1).

Clasificación	Profundidad (mm)	Ulceración / Mitosis
T in situ	No aplicale	No aplicable
T1	<1	a. sin ulceración y mitosis <1/mm² b. con ulceración o mitosis >1/mm²
T2	1-2	a. sin ulceración b. con ulceración
T3	2-4	a. sin ulceración b. con ulceración
T4	>4	a. sin ulceración b. con ulceración
N	Número de linfonodos metastásicos	Carga metastásica
N0	0	No aplicable
N1	1	a. micrometástasis b. macrometástasis
N2	2-3	a. micrometástasis b. macrometástasis c. metástasis en tránsito / lesiones satélite sin linfonodos afectados
N3	4 o más linfonodos o conglomerado o Metástasis en tránsito / lesiones satélite con linfonodos afectados	
M	Sitio	LDH
M0	Sin metástasis a distancia	No aplicable
M1	Piel lejana, metástasis subcutáneas o en linfonodos	Normal
M2	Metástasis pulmonares	Normal
M3a	Cualquier otra metástasis visceral	Normal
M3b	Cualquier metástasis a distancia	Elevada

Tabla 1. Clasificación TNM para el Melanoma. Clasificación realizada por la AJCC y sometida a revisión el año 2009. En esta nueva versión se incorpora la profundidad del melanoma, la presencia de ulceración, el índice mitótico, el grado de compromiso ganglionar según número de ganglios comprometidos y según si es clínicamente evidente este compromiso. También incorpora el lugar de las metástasis a distancia y la presencia de LDH alta.

En función de esta clasificación se definen 5 estadios (del 0 al IV). A su vez el estadio I se subdivide en A y B, mientras que el II y III se subdividen en A, B y C. El estadio 4 no se subdivide y comprende a todos los melanomas en que se detecta una o más metástasis a distancia. El Tumor in situ corresponde al estadio cero (Tabla 2).

	T1a	T1b	T2a	T2b	T3a	T3b	T4a	T4b
N0	IA	IB	IB	IIA	IIA	IIB	IIB	IIC
N1a	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB
N1b	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC
N2a	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB
N2b	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC
N2c	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC
N3	IIIC	IIIC	IIIC	IIIC	IIIC	IIIC	IIIC	IIIC

Tis=0, M1-M3b=IV

Tabla 2. Estadíos clínicos del melanoma basado en la clasificación TNM. Cuando corresponde a un tumor *in situ* (Tis) se habla de estadio 0, y con cualquier metástasis a distancia corresponde a un estadio IV.

La tasa de sobrevida está directamente relacionada al momento en el cual se detecta la enfermedad, siendo aproximadamente del 90% al detectarse en etapa I, hasta un 80% de sobrevida al detectarse en etapa IIA, que se reduce al 40% para la etapa IIC, 60% al detectarse en etapa IIIA pero solo un 20% al detectarse en etapa IIIC. Al detectarse en etapa IV presenta solo una media de sobrevida de 8 a 9 meses, y menos (Balch y cols., 2009) (Figura 1).

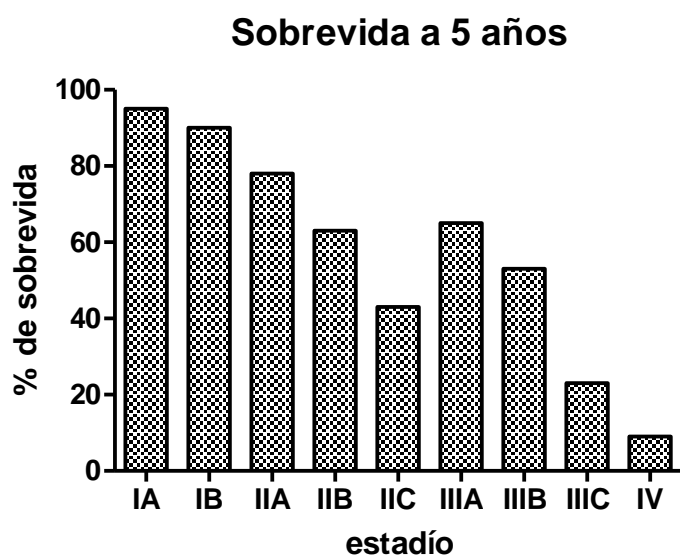


Figura 1. Sobrevida a 5 años según el estadio al momento del diagnóstico. Mientras más avanzado es el estadio del melanoma al momento del diagnóstico, menores son las probabilidades de sobrevida a largo plazo.

Terapias convencionales para el melanoma

Las alternativas terapéuticas para cada etapa se definen en guías de manejo del melanoma, a modo de recomendaciones y como forma de unificar criterios entre los clínicos.

Para el melanoma en etapa I y II la resección quirúrgica del tumor es la acción principal para erradicar la enfermedad. Algunos grupos proponen márgenes quirúrgicos que van desde 5mm para tumores *in situ* hasta 2 cm como margen para tumores con Breslow de 4 mm (Heaton y cols., 1998). En cuanto a la profundidad, se recomienda llegar hasta la fascia muscular, pero sin extirparla, pues aquello no está demostrado que mejore la sobrevida, y dificulta la técnica quirúrgica. La biopsia selectiva del ganglio centinela se reserva para pacientes en etapa I y II, es decir sin ganglios clínicamente afectados), para identificar a un subgrupo de pacientes que se beneficiarían de una linfadenectomía regional por presentar metástasis ocultas (Morton y cols., 2006).

La quimioterapia se reserva para tumores metastásicos, una vez que la enfermedad está avanzada y el pronóstico es malo. La dacarbazina es el fármaco mayormente utilizado y consigue un 20% de respuestas y entre un 4 y 6% de remisiones completas (Grenn y cols., 1998). La Temozolamida es un análogo de la dacarbazina que actualmente también está siendo utilizada ya que es mejor tolerada y cruza la barrera hematoencefálica, lo que resulta ser útil en metástasis cerebrales. Además esta última tiene el beneficio de poderse administrar por vía oral, no así la dacarbazina. Sin embargo la temozolamida produce linfopenia significativamente mayor que la dacarbazina, y su costo es muy elevado, por lo que algunos autores recomiendan el uso de dacarbazina (Teimouri y cols., 2013).

La fotoemustina, al igual que la temozolamida es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, pero las tasas de respuesta globales resultan ser bajas y la duración de la respuesta es corta (Quéreux y col., 2011).

La combinación de agentes quimioterapéuticos es lo que pareciera dar mejores resultados, siendo la más usada: dacarbazina, carmustina, cisplatino y tamoxifeno, con un 55% de respuesta. Otra combinación utilizada es bleomicina, vincristina, lomustina y dacarbazina. Otros autores proponen cisplatino, vinblastina y dacarbazina. Para melanomas en etapa IIIC se han conseguido buenos resultados con perfusión hipertérmica de cisplatino o melfalán asociado o no a TNF (Cornett y cols., 2006, Deroose y cols., 2012) que se utiliza para salvar extremidades localmente afectadas por melanoma.

Uno de los más recientes agentes quimioterapéuticos salidos al mercado es Vemurafenib, aprobado en agosto del 2011 por la FDA como monoterapia para pacientes con melanoma portadores de la mutación V600 en el gen BRAF (Bollag y cols., 2010). Más adelante, en mayo del 2013, la FDA aprobó también las drogas Dabrafenib y Trametinib para pacientes con melanoma avanzado portadores de esta mutación (Gribney y cols., 2013).

La radioterapia está indicada principalmente en tumores de cabeza y cuello tras una cirugía, en recidivas locales tras disección ganglionar, cuando hay múltiples ganglios afectados, disección incompleta o extensión extracapsular. A pesar de esto existe la creencia de que la radioterapia resulta ser inútil en el tratamiento del melanoma, lo que determina que tan solo el 1% de los pacientes sean sometidos a ella, considerando que se podrían beneficiar hasta el 23% de los

pacientes para los cuales estaría teóricamente indicada. En metástasis cerebrales, radioterapia más temozolamida es la elección como terapia paliativa.

La terapia *antisense* (Oblimersen) que bloquea el gen de bcl-2 en combinación con dacarbazina ha demostrado mejores resultados que la dacarbazina por sí sola (Bedikian y cols., 2006, Ott y cols., 2013). Otras moléculas cuyos genes son candidatos a ser bloqueados, se encuentran en estudio, esto ocurre para TGF- β , IL-10, etc.

Vacunas para prevención: en este contexto se puede mencionar la vacuna diseñada para la prevención del virus papiloma humano (HPV), que puede causar cáncer cervicouterino. También la vacuna para el virus de la hepatitis B puede ser considerada preventiva del cáncer de hígado, debido a la directa relación entre virus de la hepatitis B y el hepatocarcinoma.

Inmunoterapia

La inmunoterapia, entendida como un tipo de tratamiento que busca estimular el propio sistema inmune del paciente con el fin de detener o retardar el crecimiento de tumores, se ha posicionado en los últimos años como una promisoriosa estrategia para combatir el cáncer. Existen diversos tipos de inmunoterapia, y una manera de clasificarla, es según si el agente inmunoterapéutico induce inmunidad pasiva o activa (Figura 2).

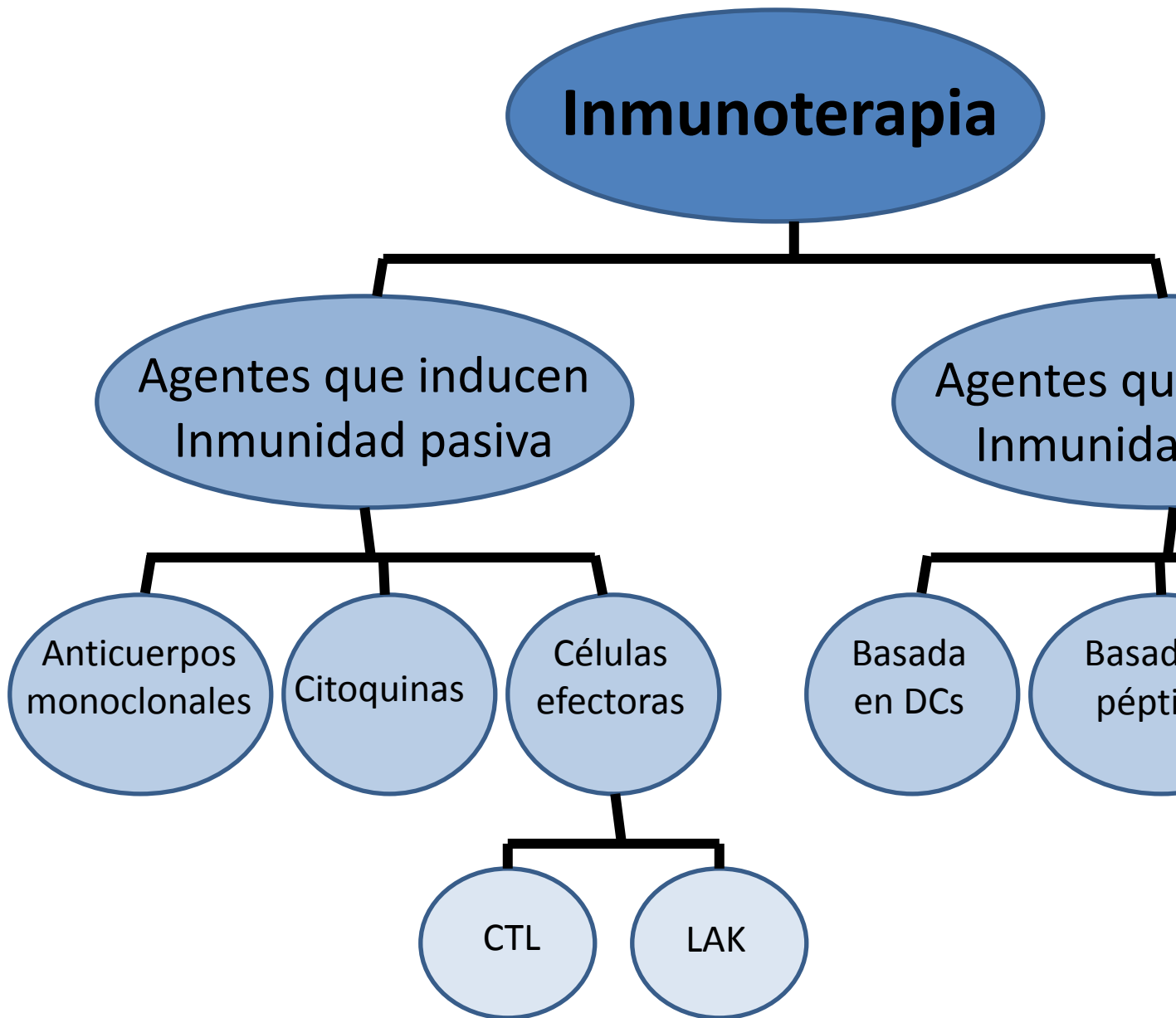


Figura 2. División esquemática de los tipos de inmunoterapia que existen hoy en día, mucho de los cuales se encuentran en desarrollo y su uso es experimental. Otros sin embargo, ya cuentan con aprobación por los organismos internacionales y su efecto en provocar la regresión o detener el avance de tumores ha sido ampliamente demostrado.

A continuación se describen de manera muy resumida los principales tipos de inmunoterapia:

Anticuerpos monoclonales: estos tienen diversas funciones según la molécula a la que están dirigidos y si esta es expresada directamente por las células cancerosas o bien por células del sistema inmune como los linfocitos T. Uniéndose a las células tumorales permiten que el sistema inmune reconozca estas células como blanco y las pueda eliminar, también pueden unirse a receptores implicados en el crecimiento celular y bloquearlos, etc. También se han desarrollado anticuerpos conjugados con moléculas radioactivas que al unirse a la célula tumoral emiten

radiación directa sobre esta célula, tal es el caso de ribritomumab tiuxetan y tositumomab. Los anticuerpos también ayudan para determinar el tipo de cáncer de una biopsia por ejemplo, o mediante estudio de imágenes determinar en que lugar del cuerpo se acumulan las marcas radioactivas. Otros anticuerpos transportan medicamentos dirigidos a las células cancerosas, como es el caso de Brentuximab vedotin para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y no Hodgkin. Clásicamente se ha relacionado la inmunidad basada en anticuerpos con la inmunidad pasiva, sin embargo recientemente se ha publicado que anticuerpos inyectados en sangre de pacientes con ciertas enfermedades como en artritis reumatoide, puede inducir una respuesta de memoria (Díaz-Torné y cols., 2013).

La FDA ha aprobado el uso de diversos anticuerpos monoclonales: Bevacizumab, Alemtuzumab, Cetuximab, Trastuzumab, Panitumumab, Ofatumumab e Ipilimumab, este último aprobado el año 2011 para el melanoma avanzado. Los efectos secundarios del tratamiento con anticuerpos monoclonales por lo general son leves y similares a una reacción alérgica, como erupciones cutáneas, baja de presión arterial, síntomas similares a una gripe, etc.

Interferones y citoquinas: El más comúnmente utilizado en el interferon-alfa. En pacientes con melanoma de alto riesgo (IIB y III) se ha demostrado un aumento en la supervivencia libre de enfermedad de un 10-20% con el tratamiento con IFN a dosis altas, pero existe controversia aún, si esto aumenta también la supervivencia global, pese a que el último estudio al respecto resultó favorable (Kirkwood y cols., 2001). En pacientes con melanoma de riesgo intermedio (IIA) se recomienda el uso de IFN-alfa a dosis bajas ya que aumenta la supervivencia libre de enfermedad no así la supervivencia global (Grob y cols., Pehamberger y cols.). Considerando que el uso de IFN es un tratamiento que conlleva alta toxicidad y que no está libre de efectos secundarios, se debe explicar al paciente de manera clara los riesgos y beneficios de la terapia.

Las citoquinas utilizadas para el tratamiento del melanoma tienen como misión activar y estimular la proliferación de linfocitos como es el caso de la IL-2, que se ha utilizada con éxito en muchos estudios con pacientes con melanoma y cuenta con la aprobación de organismos internacionales (Escobar y cols., 2005).

Células efectoras: La transferencia adoptiva de linfocitos T antitumorales expandidos en grandes cantidades *in vitro*, ha sido explorada ya desde el año 1984 (Slankard-Chahinian y cols., 1984) y perfeccionada ampliamente por el grupo de Rosenberg en Estados Unidos (Hinrichs y col, 2014). La utilización de linfocitos autólogos activados inespecíficamente *in vitro* (LAK), se experimentó primeramente en el año 1986 para el melanoma (Balsari y cols., 1986).

Células dendríticas y péptidos: Buscan que el propio sistema inmune reconozca y combata el cáncer activando linfocitos T capaces de cumplir esta función. Hasta la fecha la única vacuna de células dendríticas aprobada por la FDA es Sipuleucel-T, diseñada para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico. Otras vacunas de células se encuentran en etapa de desarrollo y están disponibles solo a través de ensayos clínicos. Estas células dendríticas pueden ser activadas con lisados tumorales (Aguilera y cols., 2009) o con péptidos específicos de antígenos tumorales, que

sean afines por el isotipo HLA del paciente (Schadendorf y cols., 2006). También se ha experimentado con el uso de péptidos que corresponden a antígenos tumorales desnudos.

Recomendaciones internacionales para el manejo del melanoma maligno

Para el melanoma en etapa II de alto riesgo (profundidad >4mm, ulceración o alto índice mitótico), la mayoría de los expertos recomiendan que el tratamiento incluya un año de IFN- α 2b si las condiciones del paciente lo permiten. Dos grandes estudios con pacientes en estadio II de alto riesgo, muestran que incrementa la supervivencia libre de enfermedad al usar IFN- α 2b por un año como terapia de mantención, pero los resultados en la supervivencia global son discutibles (Grob y cols., 1998; Hansson y cols., 2011).

Para el melanoma en etapa III con invasión micro y macroscópica de linfonodos los expertos recomiendan 1 año de IFN- α 2b. Se ha demostrado que el interferón α 2b pegilado (que permanece más tiempo en el cuerpo) también es una buena alternativa para pacientes en estadios IIB y III.

Para pacientes en etapa IV, luego de realizar el completo estudio respectivo, el tratamiento de primera línea a considerar es realizar una metastasectomía completa cuando esto sea posible. Cuando el tumor es irresecable, los expertos recomiendan el uso de IL-2 a altas dosis, ipilimumab, vemurafenib, dabrafenib y trametinib para pacientes con BRAF mutado, participación en estudios clínicos y quimioterapia citotóxica.

En un trabajo publicado el año 2013 en la revista Nature, se presentan algoritmos para el tratamiento del melanoma en cada etapa. Lo relevante de este trabajo es que para pacientes en estadio IV, siempre se debe considerar incorporar al paciente en un estudio clínico, incluso como primera opción para pacientes que no son candidatos a cirugía con la mutación KIT+ (Kaufman y cols., 2013) (Figura 3).

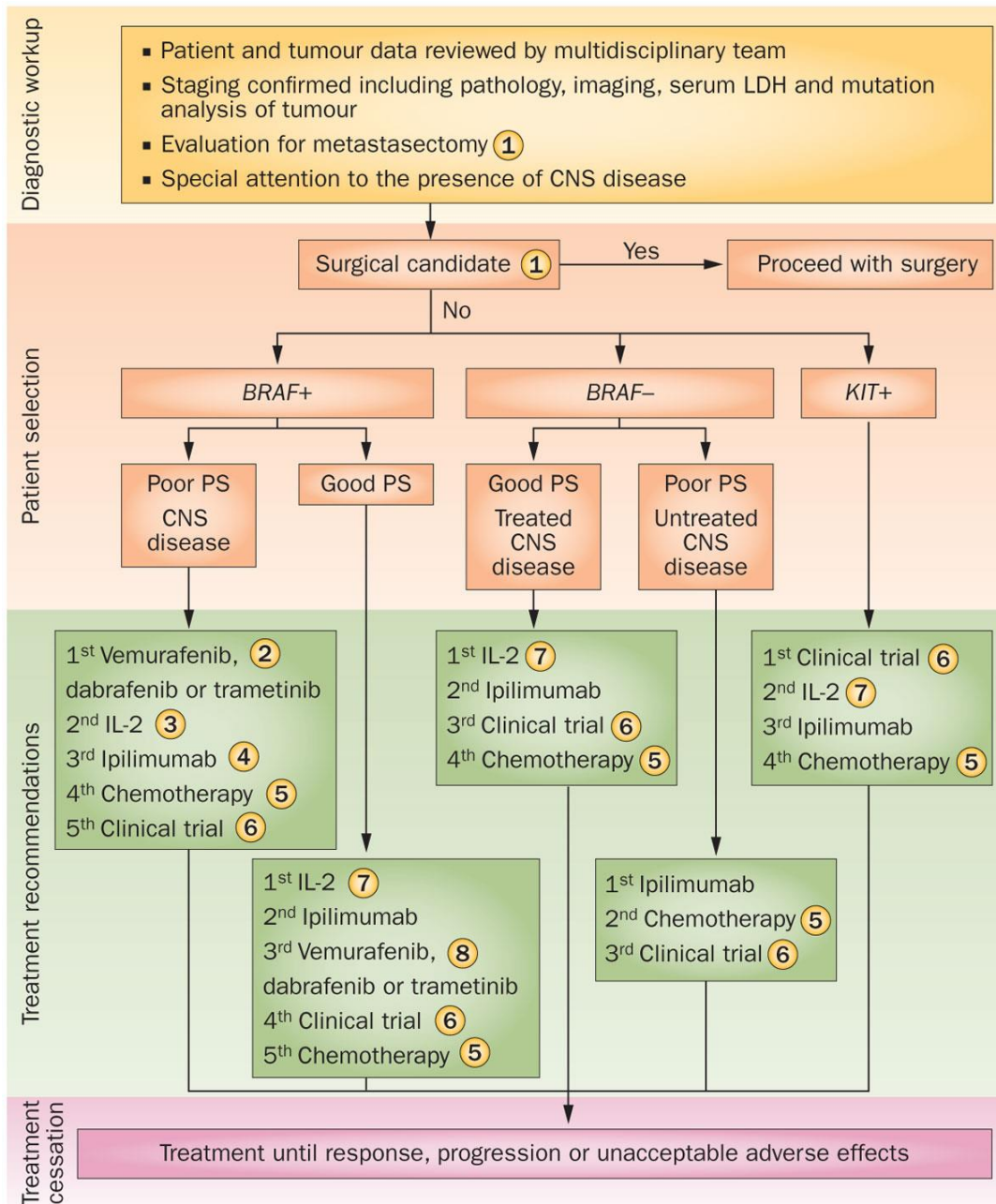


Figura 3. Algoritmo para el tratamiento del melanoma en estadio IV, publicado en la revista Nature el año 2013. Se evidencia que en todos los casos, se recomienda incorporación de pacientes en estudios clínicos.

Inmunoterapia basada en células dendríticas y antígenos asociados a melanoma

Dentro de los estudios clínicos, la inmunoterapia basada en células dendríticas tiene un papel muy relevante. Es un tipo de inmunoterapia que abarca un campo muy emergente en el cada día se observan avances relevantes y mejores protocolos para producir DC más efectivas contra el cáncer (Figura 4) (Aguilera y cols., 2009). La inmunoterapia depende de la capacidad de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL) de reconocer el complejo mayor de de histocompatibilidad clase I (MHC-I)

asociado a antígenos tumorales (TAA) en la superficie de células malignas (Brichard y cols., 1993; Kawakami y cols., 1994a; Kawakami y cols., 1994b; Restifo y cols., 2012; Smyth y cols., 2006; Van Der Bruggen y cols., 2002).

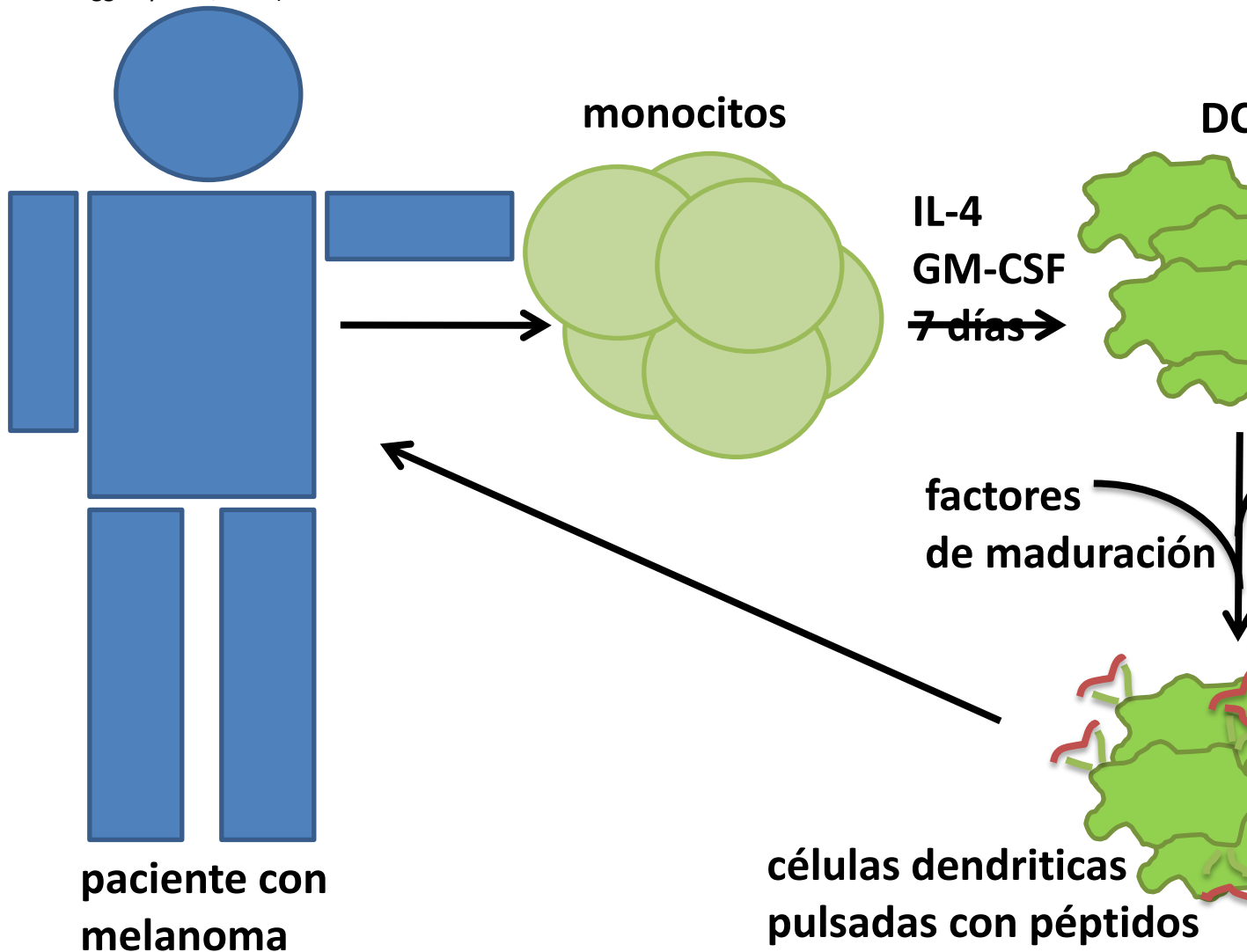


Figura 4. Esquema de protocolo de inmunoterapia basada en células dendríticas pulgadas con péptidos derivados de AAT. A partir de sangre periférica se aíslan los monocitos, los cuales se cultivan durante 7 días en presencia de GM-CSF e IL-4 para obtener DCs inmaduras. Éstas pueden ser pulgadas exógenamente con péptidos correspondientes a AAT en medio conteniendo además factores de maduración, como TNF, IL-1 β , PGE2, e IL-6. Luego estas células autólogas son utilizadas para vacunar al paciente.

La identificación de un gran número de antígenos asociados a melanoma (MAA) con restricciones MHC-I específicas, ha aumentado considerablemente la capacidad de desarrollar inmunoterapia basada en células utilizando péptidos correspondientes a TAA (Coulie y cols., 1994; Palucka y Banchereau, 2012 ; Rosenberg y cols., 1998). Como la mayoría de los MAA derivan de proteínas estrechamente relacionadas con tejidos de origen melanocítico que normalmente se sobreexpresan en melanosomas y que probablemente están involucrados en la regulación de la

melanogénesis (Adema y cols., 1994; Chen y cols., 1995; Kawakami y cols., 1994c; Sakai y cols., 1997; Winder y cols., 1994), últimamente se ha dirigido mayor atención hacia el estudio de otras proteínas de melanoma o melanocitos para identificar nuevos MAA candidatos a ser utilizados en protocolos de inmunoterapia.

Bases biológicas de la inmunoterapia. Presentación antigénica y activación de Linfocitos T

Cómo ocurre el reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T, que son las células efectoras y las que en definitiva se encargarán de erradicar el tumor, es la base para entender los protocolos actuales de inmunoterapia. Explicado de forma muy sintetizada, el receptor de linfocitos T (TCR) consiste en un conjunto de cadenas proteicas capaces de reconocer fragmentos del antígeno presentado por la molécula MHC y transmitir la información al interior de la célula. Éste puede ser alfa-beta o gamma-delta.

El TCR alfa-beta es un heterodímero compuesto por dos cadenas polimórficas con dominios similares a los de las inmunoglobulinas, V, D, J (donde reside la variabilidad) y C (región constante). Lo mismo ocurre con el TCR gamma-delta, pero éste presenta una mayor variabilidad estructural y reconoce las moléculas de histocompatibilidad “no clásicas”.

En el momento del desarrollo, los linfocitos T inmaduros comienzan a expresar las cadenas alfa-beta o gamma-delta a partir de genes que son elegidos al azar entre las múltiples versiones disponibles para cada uno de los segmentos génicos V, D y J. Luego, los linfocitos T alfa-beta son seleccionados según su afinidad por la molécula MHC-I o II, eliminando los clones con afinidad muy baja, o muy alta por la molécula MHC y sobreviviendo los de afinidad intermedia.

Si un linfocito T virgen toma contacto con un antígeno, no habrá respuesta por parte del linfocito, a menos que este sea presentado en el contexto de MHC clase I o II por una célula presentadora de antígeno que previamente fagocitó el antígeno del medio (Figura 5).

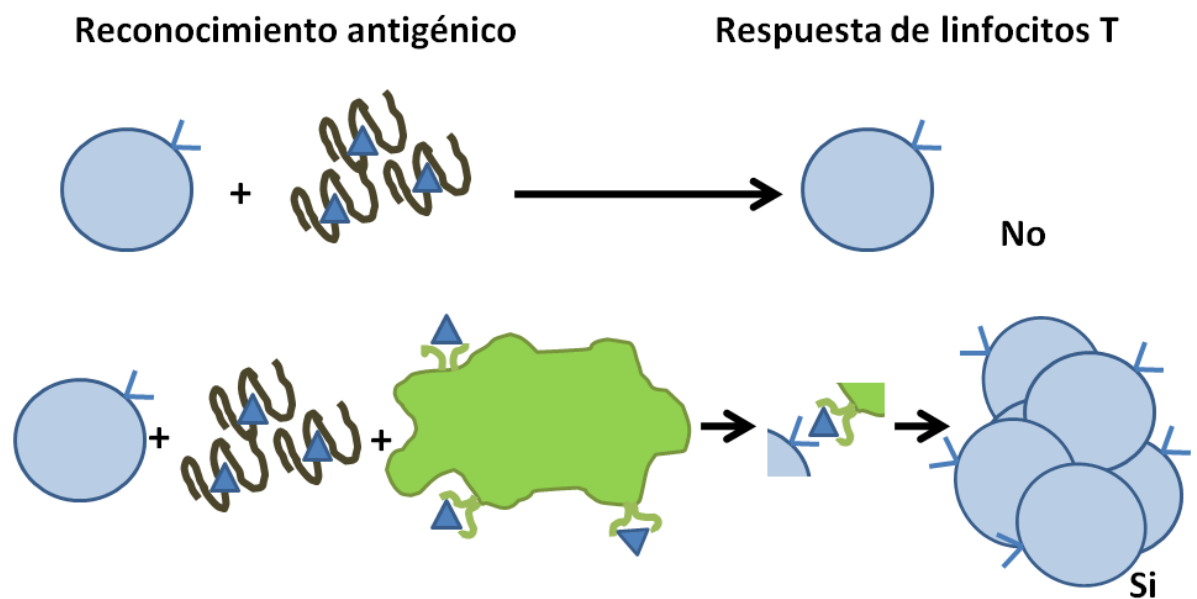


Figura 5. Generación de la respuesta inmune. Un Linfocito T virgen que toma contacto con un antígeno tumoral no generará una respuesta ante él, a menos que este antígeno sea presentado por una célula presentadora profesional en el contexto MHC adecuado si se trata de un linfocito T CD4 o CD8.

El TCR ya sea éste alfa-beta o gamma-delta, se asocia a polipéptidos monomórficos denominados CD3 y cadena ζ , encargadas de la transducción de señales al interior de la célula. Otras moléculas también ayudan al reconocimiento del antígeno, tal es el caso de las glicoproteínas CD8 y CD4 que son correceptores de unión a MHC clase I y II respectivamente. Todo esto configura lo que se denomina señal 1. La señal 2 está dada por la interacción entre otras moléculas accesorias como es el caso de CD28 que interactúa con B7 expresada en la superficie de células presentadoras profesionales como las DCs (Figura 6).

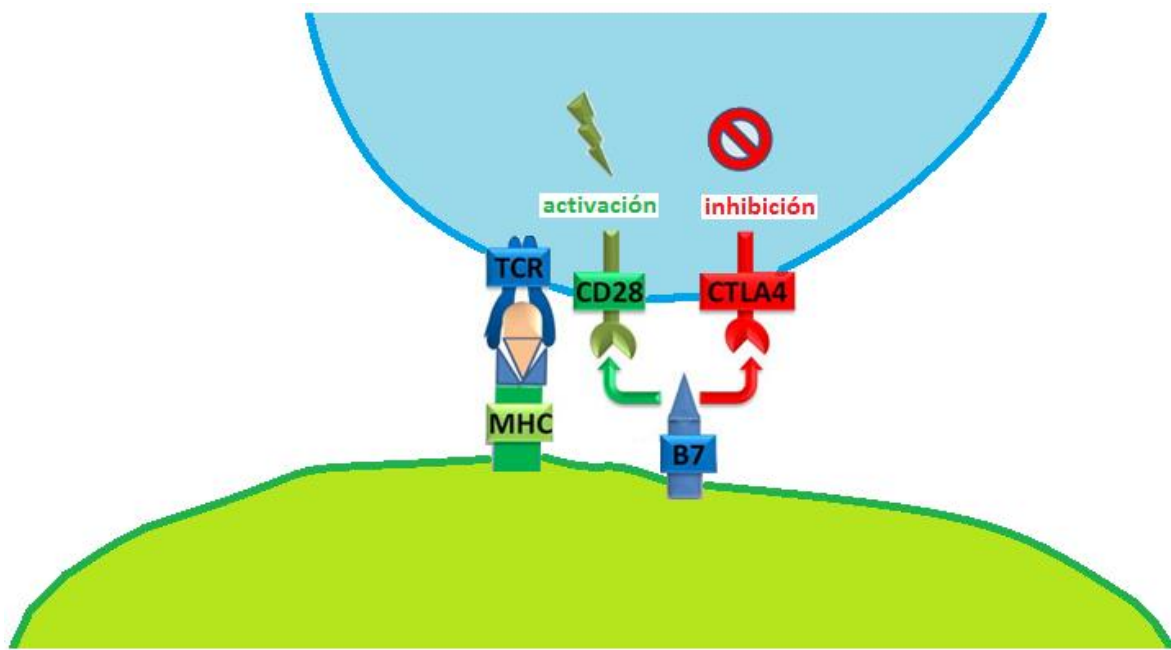


Figura 6. Activación linfocitaria. Un linfocito T hace contacto con una célula presentadora de antígeno mediante el TCR que reconoce el complejo péptido-MHC (señal 1). El linfocito T virgen expresa la molécula CD28, que al hacer contacto con B7 de la célula presentadora (señal 2) provoca la activación del linfocito. Una vez activo, el linfocito T cambia la expresión de CD28 por CTLA-4 que tiene como ligando también a B7, pero esta interacción determina la inhibición de la respuesta inmune y la anergia del linfocito.

Las moléculas coestimuladoras CD28 y CTLA-4 tienen el mismo ligando en la célula presentadora de antígeno, regulando de esta forma la respuesta inmune, ya que ambas tienen función antagonista. Cuando los linfocitos se encuentran activados, cambia la expresión de CD28 por CTLA-4, y un segundo contacto con una DC, podría anergizar al linfocito mediante la interacción CTLA-4/B7. Por ello, para la terapia del cáncer es deseable bloquear la molécula CTLA-4, lo que hace el anticuerpo Ipilimumab mencionado anteriormente ya que tiene como blanco la molécula CTLA-4 (Ribas y cols., 2005).

Para que una célula presentadora de antígeno presente péptido producto de proteínas o antígenos fagocitados en el contexto MHC clase I, es necesario que ocurra un proceso denominado presentación cruzada (Figura 7).

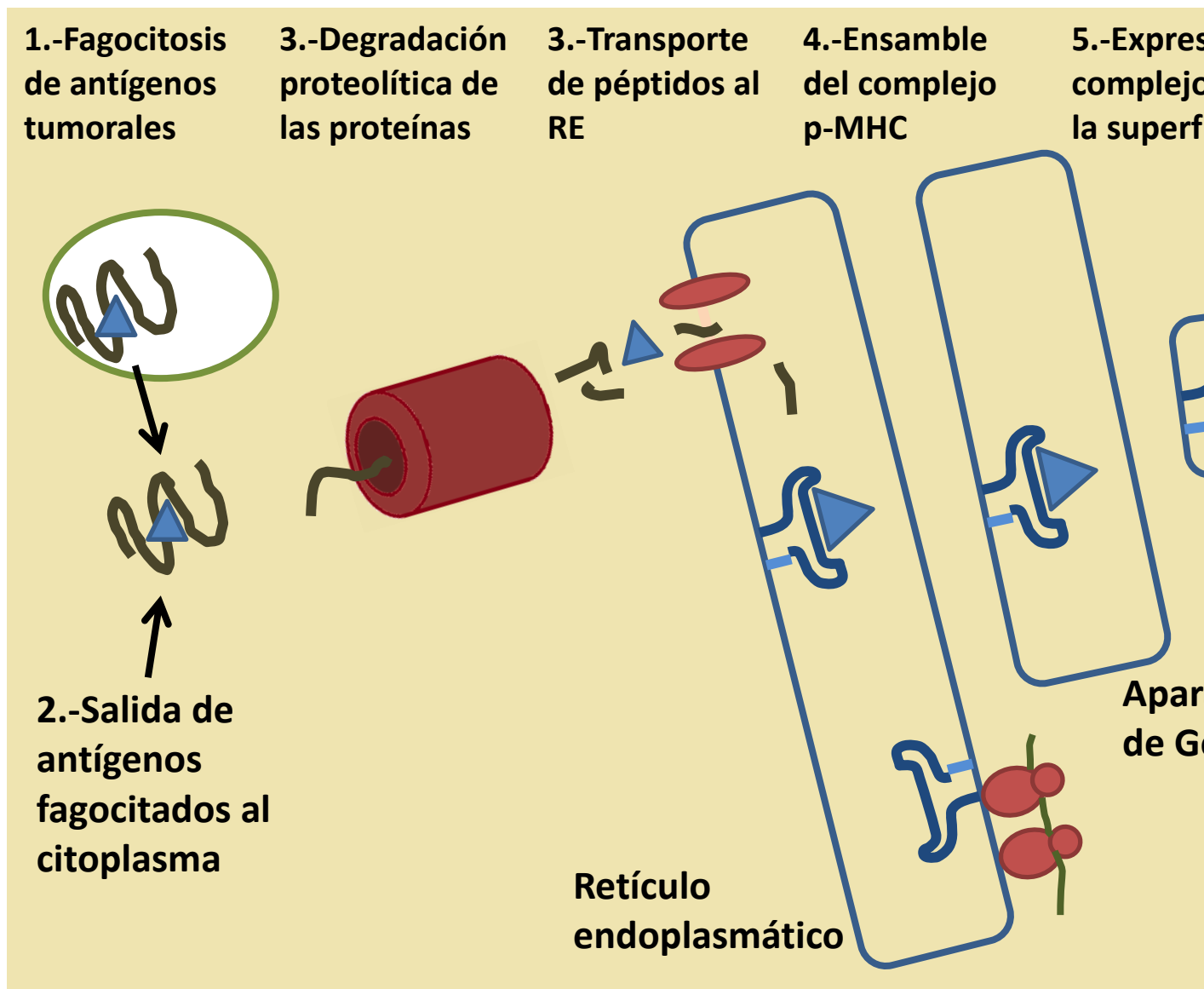


Figura 7. Presentación cruzada. Los péptidos fagocitados están contenidos en fagosomas, pero pasan a la fase citosólica por mecanismos aún no muy claros. Luego se produce la degradación proteolítica de los antígenos por acción del inmunoproteosoma. Los péptidos entran al retículo endoplasmático mediante las proteínas transportadoras TAP1 y TAP2, para unirse a la molécula MHC clase I en formación según la afinidad que tengan estos péptidos. Luego el complejo p-MHC al complejo transportador de membranas del aparato de Golgi para finalmente ser expresados en la superficie de la célula presentadora y activar a un linfocito TCD8.

Aún no están del todo claros los mecanismos que conducen a la presentación de antígenos exógenos mediante la molécula MHC-I, pero lo que está claro es que este proceso denominado presentación cruzada es capaz de llevarse a cabo sólo por células presentadoras profesionales de

antígenos, como lo son las células dendríticas, para activar a linfocitos T CD8, que constituyen el pilar fundamental en la respuesta inmune antitumoral, al reconocer y mediar la lisis de células tumorales (Figura 8).

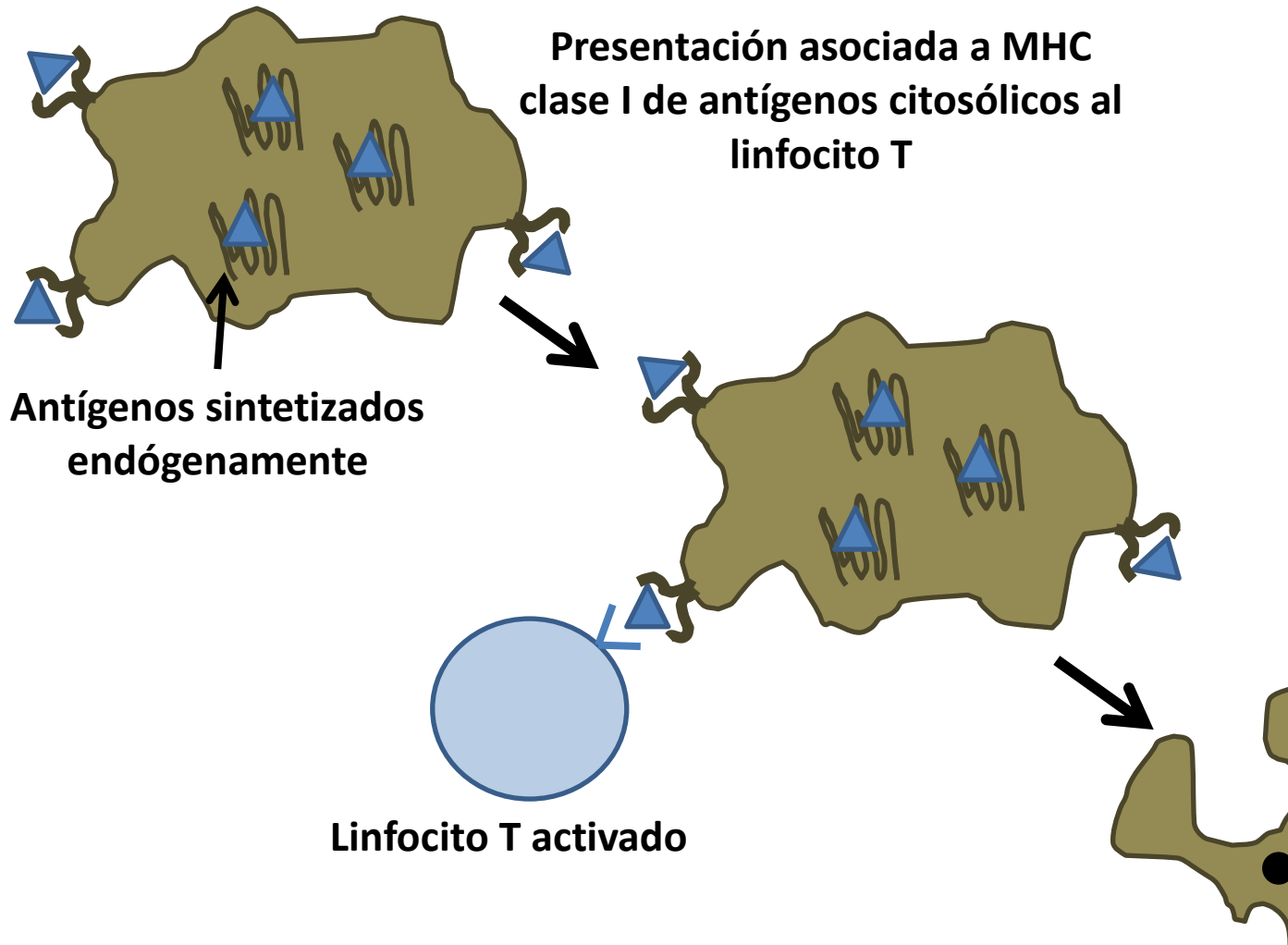


Figura 8. Reconocimiento del tumor por el linfocito T. Una célula tumoral expresa antígenos propios, que pueden ser reconocidos por un linfocito T CD8 específico en el contexto MHC-I y mediar la muerte de la célula tumoral.

Un linfocito T activo reconoce en la célula tumoral el mismo antígeno que en una primera instancia le fue presentado por una célula dendrítica. Pero en esta oportunidad al no haber una segunda señal, el linfocito media la muerte de la célula tumoral secretando granzimas y perforinas.

Para que una célula tumoral presente antígenos propios en el contexto MHC-I es necesario que ocurra intracelularmente un proceso similar al descrito anteriormente pero con algunas diferencias (Figura 9).

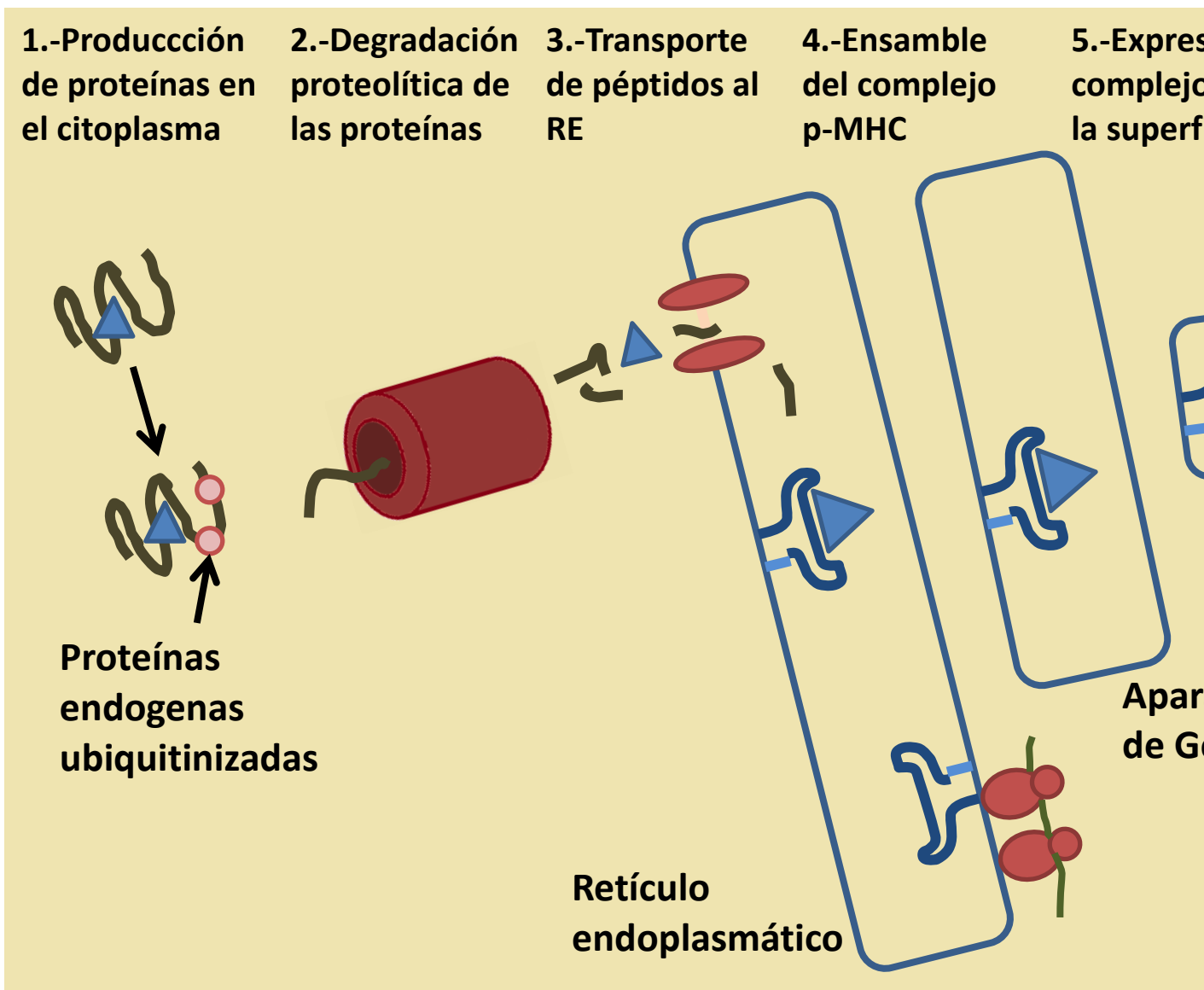


Figura 9. Procesamiento antigénico por la célula tumoral. Los antígenos tumorales son ubiquitinizados dentro de la célula, lo que conduce a la proteína a la destrucción proteolítica resultando en pequeños péptidos que entran al retículo endoplasmático y si son afines por la molécula MHC-I la estabilizan formando el complejo p-MHC que finalmente es presentado en la superficie celular, pero sin las moléculas coestimuladoras que tienen las células presentadoras profesionales de antígenos, lo que para el linfocito T activado, constituye una señal de destrucción a esta célula.

Entendiendo esto, nos damos cuenta que para realizar nuevas y mejores terapias contra el cáncer es de vital importancia la identificación de antígenos tumorales que sean capaces de activar a las células del sistema inmune. El fundamento teórico de la inmunoterapia basada en células dendríticas, consiste en la activación *in vivo* de linfocitos que puedan ser activados en los ganglios linfáticos, y luego dirigirse al sitio del tumor para frenar el crecimiento o incluso erradicar tumores.

En el ganglio linfático, el reconocimiento del complejo p-MHC por el TCR más la segunda señal constituida por las moléculas coestimuladoras adecuadas proporcionadas por las células dendríticas con las cuales se vacunó al paciente, lleva entonces a que dentro del linfocito se produzcan reacciones bioquímicas como fosforilación/desfosforilación, hidrólisis de fosfolípidos de membrana, aumento de la concentración de Ca en el citoplasma y finalmente a la activación de genes que intervienen en la activación del linfocito T. Luego de migrar al sitio del tumor, y como las células tumorales no expresan las moléculas coestimuladoras de la señal 2, el linfocito T activado reconoce el mismo complejo p-MHC en la superficie de células tumorales y se transforma en un CTL, secretando granzimas y perforinas, que finalmente provocan la lisis de la célula neoplásica (Figura 10).

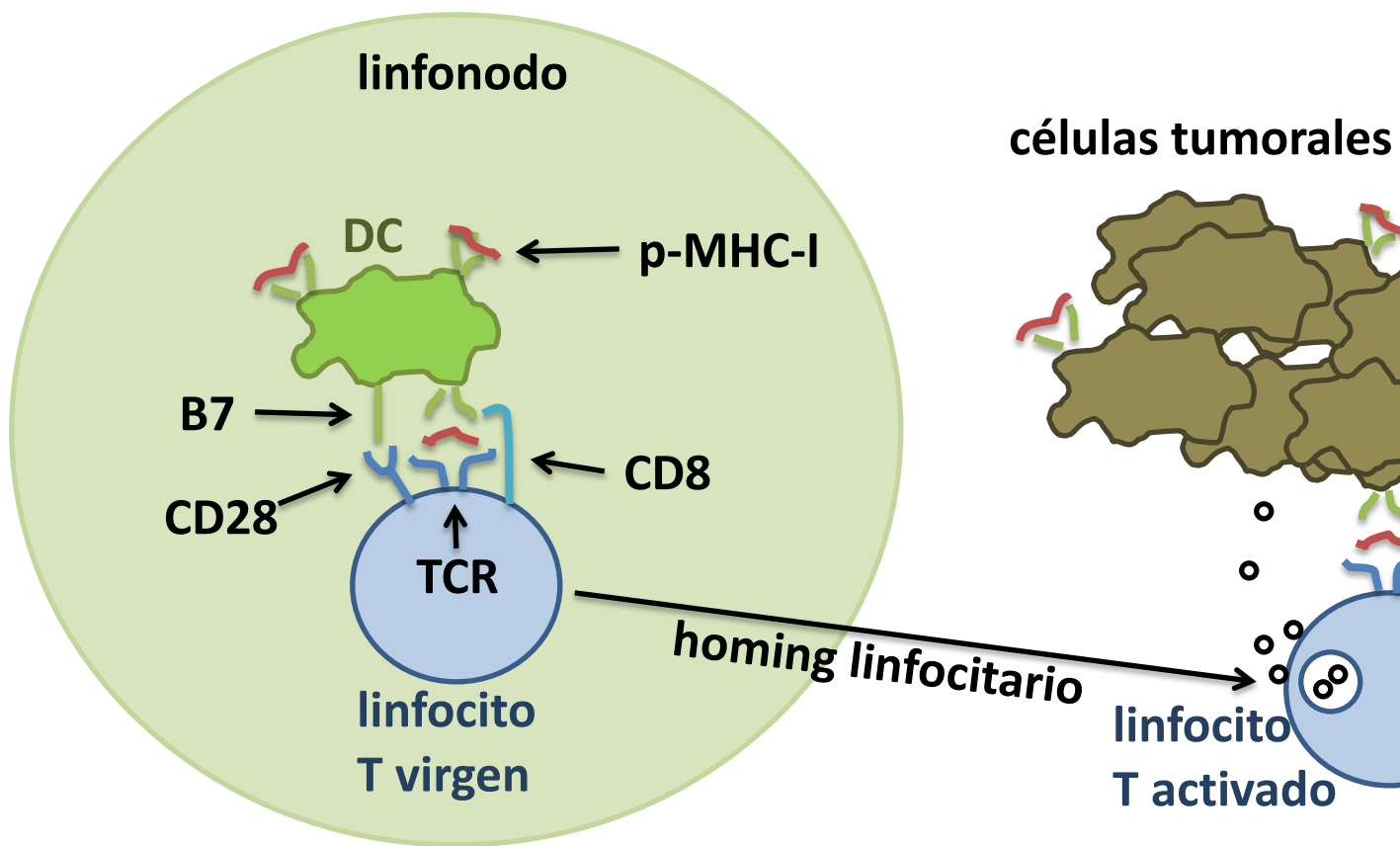


Figura 10. La activación de linfocitos T vírgenes se lleva a cabo en el linfonodo, en donde la DC pulsada con péptidos derivados de AAT es capaz de activar a linfocitos cuyo TCR sea afín por el complejo p-MHC-I. Mediante el fenómeno que se conoce como *homing linfocitario*, los linfocitos son capaces de migrar al sitio del tumor, en donde vuelven a reconocer el complejo p-MHC-I pero sin la participación de moléculas coestimuladoras, provocando la liberación de proteínas que provocan la lisis tumoral.

Inducción de tolerancia como efecto adverso

El principal obstáculo que queda por tratar en la inmunoterapia basada en péptidos es la inducción de la tolerancia de los linfocitos T, ya que la mayoría de los AAT humanos derivan de proteínas endógenas (López y cols., 2009). También hay que señalar que los TAA mejor estudiados, podrían ser considerados como relativamente dominantes, con una mayor capacidad de estabilización de MHC en comparación con la gran mayoría de los AAT presentados en la superficie de las células tumorales (Brichard y cols, 1993; Chen y cols, 1995; Kawakami y cols, 1994a; Kawakami y cols., 1994b; Kawakami y cols., 1994c). Por otra parte, varios estudios en humanos que utilizan vacunas de DC pulsadas con péptidos correspondientes a TAA dominantes y restringidos para un tipo particular de MHC (generalmente HLA-A2), muestran efectos moderados sobre el melanoma y la tasa de supervivencia de los pacientes al compararlos con los tratamientos de transferencia adoptiva de células o vacunas de DC utilizando lisados tumorales (Aguilera y cols., 2011; Knutson y cols., 2002; López y cols., 2009; Parkhurst y cols., 2004; Schaed y cols., 2002; Slingsluff y cols, 2001; Vonderheide y cols., 2004). Otros estudios basados en modelos murinos demostraron que la falta de eficacia observada se debe principalmente a la inducción de la tolerancia en el repertorio de células T hacia el complejo p-MHC-I con TAA dominantes (Colella y cols., 2000; Gross y cols., 2004; Grossmann y cols., 2001; Hernández y cols., 2000). Por otra parte, la gran mayoría de la AAT caracterizados no se expresan ampliamente y ni siquiera están implicados en la proliferación de células tumorales ni en la supervivencia. Por consiguiente, las estrategias terapéuticas que utilizan como blanco TAA que no están implicados en el crecimiento celular del tumor, podrían resultar en la selección de clones más agresivos que no expresan estos antígenos específicos (Schmollinger y cols., 2003; Wenandy y cols., 2008).

Generación de péptidos modificados como técnica para romper la tolerancia

Asimismo, la inmunogenicidad de los antígenos asociados a tumor (AAT) es a menudo débil debido a que muchos de estos son autoantígenos para los cuales el repertorio de linfocitos T efectores es regulado por los mecanismos de tolerancia existentes.

En contraste, la tolerancia a antígenos propios mediada por linfocitos T, está dirigida principalmente a epítomos dominantes de auto-antígenos, pero rara vez a epítomos de baja afinidad (Cibotti, y cols., 192; Parkhurst y cols., 1996; Valmori y cols., 1998; Hwang y cols., 2012). Más aun, estos antígenos de baja afinidad pueden inducir linfocitos T con alta avidéz por el complejo p-MHC, y de esta forma activar de manera eficiente la inmunidad antitumoral *in vivo* (Gross y cols., 2004). Por lo tanto, ya que el repertorio de CTL específicos para estos epítomos podría haber escapado del proceso de selección negativa, debería ser posible reclutar CTL de alta avidéz contra epítomos de baja afinidad por la molécula MHC-I, exhibiendo así respuestas antitumorales potentes. También se ha pensado que utilizando péptidos modificados derivados de antígenos tumorales débiles, se pueden inducir CTL de manera más eficiente tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las sustituciones en las principales posiciones de anclaje es una herramienta que comúnmente se ha utilizado para aumentar la complementariedad entre el péptido y la molécula MHC-I, aumentando así la inmunogenicidad de los AAT. Asimismo, algunos ejemplos de alteraciones en

antígenos asociados a tumor que desde hace muchos años se han utilizado en clínica, son el decámero Melan-A/Mart-1 26-35 (Valmori y cols., 1998) el péptido gp100 209/2M (Pakhurst y cols., 1996).

Sin embargo, cada isotipo de MHC-I tiene motivos de anclaje particulares, por lo que esta clase de alteraciones debería estar dirigida para cada isotipo de MHC-I. Para el isotipo MHC-I HLA-A2, Ruppert en 1993 determinó que los motivos “canónicos” de anclaje son una L o M en la posición 2 y una L,V o I en la posición 9.

Tourdot y colaboradores, demostraron que al introducir un Y en la posición 1, se logra aumentar la afinidad de péptidos derivados de antígenos tumorales por la molécula MHC-I HLA-A2 (Tourdot y cols., 2000), lo que es de especial relevancia debido a que el isotipo HLA-A2 se encuentra presente en aproximadamente la mitad de la población mundial. Esta sería una interesante estrategia para aumentar la afinidad de péptidos poco afines por la molécula MHC-I, debido a que serían mejores candidatos para realizar inmunoterapia que los péptidos más afines para los cuales operaron los mecanismos naturales de tolerancia.

En un trabajo publicado anteriormente por nuestros colaboradores, se demostró que la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 2 y 3 por una glicina y una prolina respectivamente, en un péptido derivado del antígeno gp100, resulta en un aumento de la afinidad de los péptidos por la molécula de MHC-I ya que la prolina en la posición 3 del péptido interactúa con una tirosina en la posición Y159, que está conservada en la mayoría de los MHC-I conocidos en mamíferos (Van Stipdonk y cols., 2009) (Figura 11).

El mismo residuo Y159 interactuaría con el primer aminoácido de la cadena peptídica, y cuando éste se sustituye por una tirosina, la interacción sería mejor (Huang y cols., 2013).

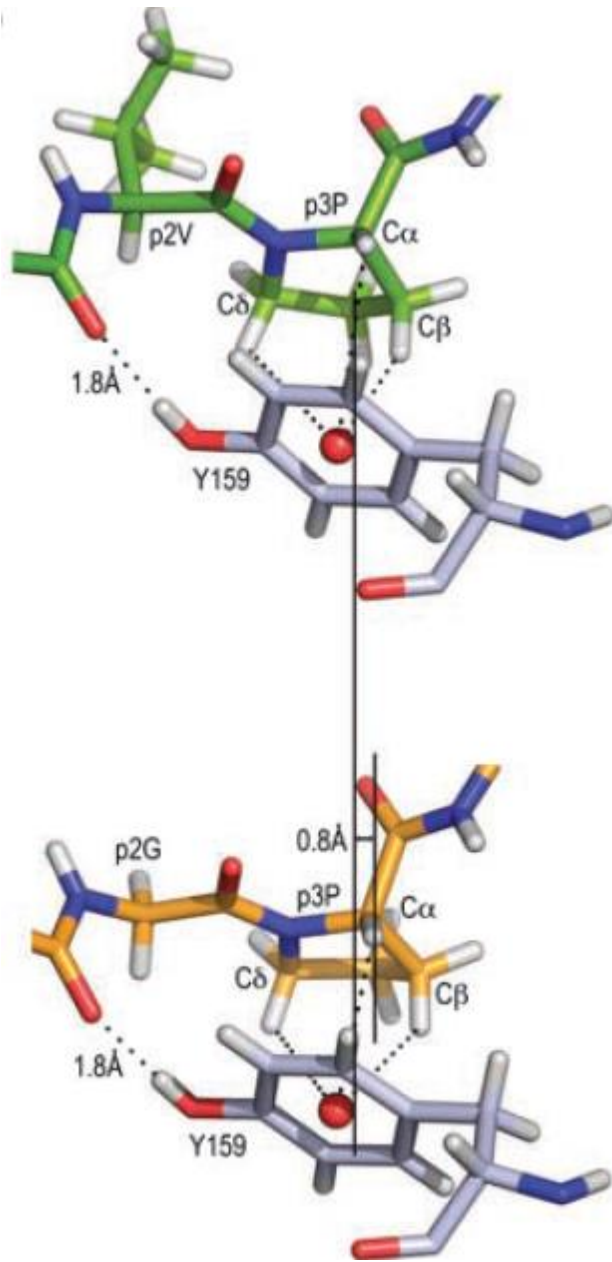


Figura 11. Bases estructurales de la interacción del MHC-1 (blanco) y los tres primeros aminoácidos del péptido correspondiente a un AAT (verde arriba y amarillo abajo). Al realizar un cambio aminoacídico en la posición 2, cambiando una V por una G, permite un leve movimiento translacional de la cadena lateral de p3P, que resulta en una mejor geometría con la cadena lateral del aminoácido Y159 de la cadena MHC-I que esta conservado en la mayoría de los mamíferos.

MC1R

El receptor de melanocortina 1 (MC1R) es el ligando natural es la hormona estimulante de melanocitos alpha (α -MSH) (Chhajlani y Wikberg, 1992). Es una proteína MC1R de 35 kDa, que pertenece a un subgrupo de la familia de receptores acoplados a proteína G, y se encuentra principalmente en melanomas y melanocitos (Tatro y cols., 1990; y cols., 1996). Se ha demostrado

también la expresión de MC1R en varios otros tejidos humanos incluyendo las glándulas suprarrenales, la hipófisis, el cerebelo, placenta, testículos, monocitos y macrófagos activados *in vitro* y en células dendríticas (DC), aunque a niveles significativamente más bajos en comparación con las células de melanoma (López y cols., 2007; Salazar-Onfray y cols., 2002; Thornwall y cols., 1997).

Péptidos derivados de MC1R capaces de inducir CTL específicos *in vitro*

En nuestro laboratorio hemos identificado tres péptidos nonaméricos, hidrofóbicos derivados de MC1R: MC1R291 (AIIDPLIYA), MC1R244 (TILGIFFL) y MC1R283 (FLALIICNA) que se unen con baja afinidad a la molécula MHC-I HLA-A2 y pueden activar CTL específicos en PBMC de donantes sanos HLA-A2+ (Salazar-Onfray y cols., 1997). Por otra parte, los CTL específicos anti-MC1R reconocen eficientemente células de melanoma HLA-A2+ MC1R+, lo que demuestra que estos epítomos derivados de MC1R son naturalmente procesados y presentados en el contexto MHC-I en la superficie de células de melanoma (Salazar-Onfray y cols., 1997).

En este estudio, se evaluó la presencia de precursores específicos anti-MC1R en poblaciones de CTL derivadas de PBMC y de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL, ambos obtenidos de pacientes con melanoma. Cinco líneas de CTL reconocen HLA-A2 en complejo ya sea con MC1R244 o MC1R291, dos líneas de CTL reconocieron MC1R283. Sorprendentemente, una cantidad predominante de todos los TIL evaluados muestran actividad citotóxica significativa contra los tres epítomos de MC1R en complejo con HLA-A2. Además, tres clones de células T CD8 +, aisladas a partir de un TIL (TIL-1206), son capaces de lisar de manera eficiente las células diana cargadas con el péptido MC1R244. Es importante destacar que, también se identificaron subconjuntos de células T CD8+ específicas para MC1R291 usando tetrámeros HLA-A2/MC1R291 en TIL aislados a partir de biopsias de melanoma.

Péptidos modificados derivados de MC1R con mayor afinidad por la molécula MHC-I

Sintetizamos péptidos derivados del péptido MC1R291 con algunas modificaciones aminoacídicas cambiando el aminoácido 1A por una tirosina (1Y), el aminoácido 9A por una valina (9V) y con ambas modificaciones al mismo tiempo.

Evaluamos luego la afinidad y estabilidad de los péptidos modificados por la molécula HLA-A2. Todas las modificaciones demostraron mayor afinidad y estabilidad que el péptido nativo de MC1R, confirmando lo publicado anteriormente por Tourdot y colaboradores en el año 2000, con respecto a la modificación 1Y.

Al generar CTL específicos a partir de linfocitos de sangre periférica de donantes sanos, utilizando los péptidos modificados y el péptido original de MC1R, se observó que para algunos donantes los péptidos modificados logran generar una respuesta *in vitro* específica, mientras que con el péptido original no se observa lo mismo. Sin embargo para otros donantes el péptido original funcionó mejor que los péptidos modificados en cuanto a la capacidad de generar una respuesta CTL específica. Por esto los péptidos modificados no demostraron ser significativamente mejores que

el péptido natural de MC1R, para inducir linfocitos T citotóxicos a partir de PBMC de donantes normales. Sin embargo, utilizando los péptidos modificados para la generación de linfocitos específicos, vemos que aumenta considerablemente el rendimiento con respecto a utilizar sólo el péptido original.

Tomando en conjunto nuestros resultados, se demuestra que varios epítomos derivados de MC1R de baja afinidad por la molécula HLA-A2 pueden inducir una respuesta significativa tanto *in vitro* como *in vivo* contra células de melanoma. Además demostramos la presencia de CTL específicos anti-MC1R en TILs de pacientes con melanoma. Por consiguiente, creemos que estos epítomos podrían ser útiles en futuras estrategias de inmunoterapia contra el melanoma y el uso de péptidos modificados resulta ser una estrategia eficaz en generar líneas anti-MC1R en pacientes en los cuales el péptido original no funciona.

HIPÓTESIS

Este trabajo contempla dos hipótesis principales que se describen a continuación:

“Existen linfocitos contra péptidos derivados MC1R infiltrando tumores de pacientes con melanoma”.

“Péptidos modificados derivados del antígeno tumoral MC1R, con afinidad aumentada por la molécula MHC clase 1, inducirán más eficientemente linfocitos T citotóxicos que reconozcan también el péptido nativo de MC1R”.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar las características inmunogénicas de péptidos derivados de MC1R con el fin de comprender la respuesta inmune contra antígenos propios y diseñar mejores terapias contra el cáncer.

Objetivos específicos

1- Detectar linfocitos T citotóxicos específicos contra péptidos derivados de MC1R en tejido tumoral (TIL) de pacientes con melanoma.

2.- Inducir líneas de linfocitos T citotóxicos con los péptidos nativos de MC1R (244, 283 y 291) en sangre donantes normales y de pacientes con melanoma HLA-A*0201.

3.- Generar péptidos agonísticos modificados derivados de MC1R, estudiar su afinidad y estabilidad.

4.- Generar líneas de CTL específicos para péptidos agonísticos modificados y medir su capacidad de reconocer melanoma HLA-A*0201 que expresen MC1R.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Tejidos tumorales y/o muestras de sangre periférica se obtuvieron de pacientes con melanoma en etapa avanzada (estadio IV), tratados en Radiumhemmet, Hospital Universitario Karolinska y en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Todos los protocolos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética del Hospital de la Universidad Karolinska, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia y por el Comité de Bioética de la Investigación Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Líneas celulares

Aparte de las líneas celulares de melanoma HLA-A2+ FM3D y FM55.M1, amablemente donadas por el Dr J. Zeuthen (Cancer society, Copenhagen, Dinamarca), todas las líneas celulares de melanoma (DFB, DFW, FMS, AK, BL, DL, 0549, AA, y AMK.) utilizado en este estudio se establecieron en el Departamento de Microbiología, Biología Celular y Tumoral (MTC) (Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia) y se han mantenido en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile. La línea T2 deficiente en TAP, la línea C1R-A2 deficiente en MHC-I y transfectada con HLA-A2, la línea de cáncer de colon SW480 y las líneas celulares de cáncer de ovario OVA3507, se adquirieron de ATCC (Manassas, VA, EEUU).

Síntesis de péptidos asociados a melanoma restringidos a HLA-A2

Todos los péptidos derivados de melanoma y péptidos control (Tabla 3 y Tabla 4) se sintetizaron de acuerdo con métodos de fase sólida estándar y se purificaron utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como se describe previamente (Kawakami y cols., 1994a). La identidad y pureza de los péptidos se determinó mediante HPLC analítica y espectrometría de masa asistida por matriz de ionización/desorción láser (MALDITOF). Los péptidos se disolvieron a una concentración de 5 nM o a 10 µg/µl en DMSO (Sigma-Aldrich) y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

Generación de células T específicas para MC1R y CTL específicos para melanoma

PBMC de pacientes HLA-A2+ con melanoma se aislaron por gradiente de densidad en Ficoll/Hypaque (Pharmacia Upjohn, Uppsala, Suecia). Un total de 5×10^7 células de PBMC aisladas se sembraron en botellas de 75 cm² en medio libre de suero (AIM-V, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) en un volumen total de 10 ml y se incubaron durante dos horas a 37°C. La fracción de células no adherentes que corresponde a PBL, se aisló suavemente y fue criopreservada en FBS con 10% de DMSO, a -80°C hasta su posterior uso. Las células adherentes que corresponden principalmente a monocitos, se mantuvieron en cultivo durante 7 días en medio AIM-V conteniendo 500 U/ml de interleuquina 4 humana recombinante (rhIL-4) (US-Biological, Swampscott, MA, EEUU) y 800 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano recombinante, (rhGM-CSF) (Schering Plough, Brinny Co, Irlanda), y fueron

alimentadas cada dos días con medio fresco suplementado. Luego de una semana de cultivo, las células se estimularon por 48 horas antes de la cosecha con 0,5 ng/ml de factor de necrosis tumoral alfa humano recombinante (rhTNF- α), 0,5 ng/ml de interleuquina-6 recombinante humana (rhIL-6), 2 ng/ml de interleuquina-1 beta humana recombinante (rh-IL-1 β) y 1 ng/ml de prostaglandina E2 (PGE2). Las células se cosecharon, se contaron y se resuspendieron a una concentración final de 6×10^5 células/ml. Luego se tomaron alícuotas de 0,5 ml y se incubaron en una placa de 6 pocillos, cargando las células con los diferentes péptidos durante dos horas a 37°C. El resto de células no utilizadas fueron congeladas a -80 ° C.

Las células no adherentes o PBL, congeladas el primer día, fueron descongeladas y co-cultivadas con las DCs autólogas generadas previamente y cargadas con los péptidos a una relación de 20:1 (PBL:DC) en medio RPMI 1640 (Invitrogen) con 10% de SFB (Invitrogen) suplementado con 5 ng/ml de rhIL-6 (eBioscience) y 0,4 ng/ml de rhIL-12 (ProSpec-Tany TechnoGene). Luego de 10 días del primer co-cultivo, las células se re-estimularon con DCs autólogas (previamente congeladas) a una relación de 20:1, y se mantuvieron a partir de entonces con 100 U/ml de rhIL-2 y 10 ng/ml de rhIL-7 por un período adicional de 10 días. Las siguientes estimuciones (tercera y cuarta) se llevaron a cabo cada 10 días utilizando monocitos autólogos crioconservados previamente. Después de cuatro estimuciones, los CTL se seleccionaron positivamente para CD8+ mediante micro beads magnéticas, según el protocolo del fabricante (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

También se obtuvieron líneas de CTL derivadas de PBL de pacientes con melanoma, específicas para melanomas autólogos HLA-A2+. Las células de PBL recibieron cuatro rondas de estimuciones semanales con células tumorales autólogas. Brevemente, 10×10^6 células de PBL de un paciente con MM (BL) se incubaron periódicamente con células de melanoma autólogas irradiadas en una proporción de 20:1 (E:T) en presencia de 100 U/ml de rhIL-2. La IL-2 siempre se añadió 12 h después de la estimulación con las células tumorales.

La actividad citotóxica de los CTL derivados de PBMC y TIL se midió mediante la capacidad de lisar células T2 o C1R-A2 cargadas exógenamente con péptidos, así como contra células de melanoma autólogas. K562 y líneas de melanoma HLA-A2- se utilizaron como controles negativos en los ensayos de liberación de ^{51}Cr que se realizaron después de dos o tres semanas de cultivo *in vitro*.

Linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) y líneas celulares de melanoma derivadas de pacientes

Suspensiones de células individuales obtenidos a partir de ganglios linfáticos infiltrados de pacientes HLA-A2+ o tumores metastásicos frescos, se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI suplementado con 10% de FBS y 100 U/ml de rhIL-2 (para los cultivos TIL) o 1 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A (para cultivar líneas celulares de melanoma). Las células se estimularon cada tres días con los mismos medios suplementados. En algunos casos, los TIL se estimularon una vez con células de melanoma autólogas irradiadas durante la segunda semana de cultivo *in vitro*. Las células se mantuvieron en cultivo hasta una confluencia adecuada para el caso de los tumores y a una concentración adecuada para el caso de los linfocitos (hasta 2×10^6

células/ml). Después de aproximadamente 10 pasajes de cultivo se obtuvieron las líneas celulares de melanoma.

Expansión de TILs mediante feeders.

Los TIL obtenidos se expandieron a través de un protocolo de expansión rápida denominado feeders. Brevemente, $2,5 \times 10^6$ células de TIL se cultivaron en botellas de cultivo T75 (BD Biosciences, California, EEUU) en un volumen total de 45 ml de CellGro (CellGenix, Freiburg, Alemania) suplementado con suero humano al 2% (Lonza, Basilea, Suiza) y 30 ng/ml de OKT3 (AbCam Cambridge, Reino Unido). Se adicionó PBMC de 2 donantes distintos irradiados a 80 Gy a una concentración 100 veces mayor que el TIL (100:1). 24 h después, se añadieron 5 ml de medio suplementado con 3000 U/ml de IL-2 (Peprotech, EEUU) para obtener una concentración final de 300 U/ml. Cada 4 días, el 50% del medio se cambió por medio fresco con 600 U/ml de IL-2. Cuando la densidad se consideró lo suficientemente alta (por lo menos 2×10^6 células de TIL/ml) en aproximadamente 10 a 20 días de cultivo, las células se separaron en dos botellas T75 agregando medio suplementado para una concentración final de 300 U/ml de IL-2.

Preparación de tetrámeros HLA-A2/MC1R

El replegamiento y tetramerización de los complejos de p-MHC derivados de MC1R y controles (HIV₇₇₋₈₅ y MART-1₂₇₋₃₅) se realizó como se ha descrito previamente (Michaelsson y cols., 2000). Debido a la alta hidrofobicidad del péptido MC1R283, no se pudo producir el tetrámero de éste péptido. Las moléculas de la cadena pesada del HLA-A2 contienen péptido sustrato BirA (BSP) se replegaron con $\beta 2m$ humana y los péptidos MC1R244 o MC1R291. Ambos complejos MHC se purificaron a partir de entonces y fueron enzimáticamente biotinilados con la enzima BirA y biotina (Avidez, Denver, CO, EEUU). Los complejos p-MHCs biotinilados se mezclaron luego con estreptavidina (BD Biosciences) y conjugado con ficoeritrina (PE) en una relación molar 4:1.

Análisis de poblaciones de linfocitos T anti-MC1R mediante tetrámeros

Los TIL obtenidos a partir de biopsias de pacientes, fueron teñidas con tetrámeros HLA-A2/MC1R244, HLA-A2/MC1R291 y como control, HLA-A2 asociado a los epítomos HIV₇₇₋₈₅ o MART-1₂₇₋₃₅. Las células, fueron seleccionadas utilizando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 (eBioscience, San Diego, EEUU), y se analizaron utilizando un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las poblaciones de células positivas para tetrámero fueron seleccionadas. A pesar del hecho de que se pueden detectar células específicas para el VIH en sangre periférica de individuos VIH seronegativos utilizando tetrámeros (Alanio y cols., 2010; Legoux y cols., 2010), se considera que el porcentaje de células VIH positivas en las poblaciones TILs aislados de metástasis de melanoma podría ser considerado como cero. Se evaluaron los datos utilizando el software FlowJo (Árbol Star, Inc., Ashland, OR, EEUU).

Generación de Clones

Todos los clones de TIL se obtuvieron a partir de una línea establecida de un paciente (TIL-1206) mediante dilución limitante estándar. Brevemente, una suspensión de 10.000, 1.000, 100 y 10

células/ml de los TIL se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo en un volumen de 100 µl/pocillo. Luego se añadió a cada pocillo, 100µL del mismo medio suplementado con 30 ng/ml de OKT3, 300 U/ml de IL-2 y conteniendo PBMC irradiado a 80 Gy de dos donantes sanos a una concentración de 1×10^6 células/ml. Cada dos días se cambió el 50% del medio por medio fresco conteniendo 600 U/ml de IL-2. Aproximadamente a los 7-10 días, los pocillos que contenían células en crecimiento se seleccionaron y se expandieron como se describe anteriormente. Se consideran clones cuando menos del 36% de los pocillos de una misma placa de cultivo contiene células en expansión.

Ensayos citotóxicos

Células de melanoma, C1R-A2 y T2 se utilizaron como blanco. Las células T2 y C1R-A2 se cargaron con 2 µg/ml de cada péptido, se incubaron durante dos horas a 37°C y se utilizaron en un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron incubando células blanco (1×10^6 células de melanoma, células T2 o células C1R-A2 pulsadas con péptido) marcados con ^{51}Cr junto con células efectoras en varias proporciones de efector:blanco durante cuatro horas a 37°C. Se aislaron los sobrenadantes y se determinó la radiactividad usando un contador gamma (Wallac, Uppsala, Suecia). El porcentaje de lisis y liberación de ^{51}Cr se calculó según la siguiente fórmula: % de lisis = $100 \times (\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$. La liberación máxima se obtuvo resuspendiendo las células blanco cargadas con cromo de un pocillo del experimento al cual no se le añadieron linfocitos, y la liberación espontánea se obtuvo extrayendo cuidadosamente el sobrenadante de células blanco cargadas con cromo, de un pocillo al cual tampoco se le añadieron linfocitos. Para eliminar la actividad de las células citotóxicas activadas por linfoquinas (LAK) o células Natural Killer (NK), todos los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en presencia de un exceso de células K562 frías (sin ^{51}Cr) a una relación de 20:1.

Ensayos de Elispot

Se sensibilizaron placas de ELISpot (Millipore, MAIP N45) con 100 µl/pocillo de anticuerpo anti IFN-alpha (Mabtech, Suecia) a una concentración de 15 µg/ml en PBS 1X se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, cada placa se lavó 3 veces con PBS, y luego se bloqueó con 100 µl de medio RPMI 10% SFB incubando por 2 horas a temperatura ambiente. Luego se extrajo el medio y se agregó 100 µl por pocillo de una suspensión de linfocitos (10^6 /ml), para luego adicionar 80 µl de una suspensión de células T2 ($1,25 \times 10^6$ /ml) y 20 µl de péptido relevante a 10 µg/ml. Como control se utilizaron células T2 sin péptido (se adicionan 20 µl de RPMI solo) o con péptido irrelevante. Se incubaron las células por 12 horas a 37°C, y se detuvo la reacción lavando 6 veces con PBS 1X. Posteriormente se agregaron 100 µl por pocillo del segundo anticuerpo (anti IFN-gamma) (Mabtech, Suecia) diluido a 1 µg/ml en buffer PBS BSA 1%, y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar 6 veces con PBS 1X, se adicionaron 100 µl por pocillo de Estreptoavidina / ALP (Mabtech, Suecia) diluida 1:1000 en PBS BSA 1%. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavó 6 veces con PBS 1X, y finalmente una vez con 100 µl por pocillo de buffer sustrato (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 50mM MgCl₂, pH 9.5). Finalmente, se agregaron 100 µl de

sustrato BCIP/NBT por pocillo y se incubó desde 5 a 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción se detuvo removiendo la solución sustrato con abundante agua una vez que se observaron puntos en el fondo del pocillo. Los datos obtenidos son presentados como Colonias Formadoras de Spots (SFC)/100.000 células.

RESULTADOS

Detección de linfocitos T citotóxicos específicos contra péptidos derivados de MC1R en tejido tumoral (TIL) de pacientes con melanoma.

Para realizar estos experimentos, se llevó a cabo el protocolo descrito en materiales y métodos en el cual se obtienen líneas de TILs a partir de muestras frescas de tumor, tal como se esquematiza en la siguiente figura.

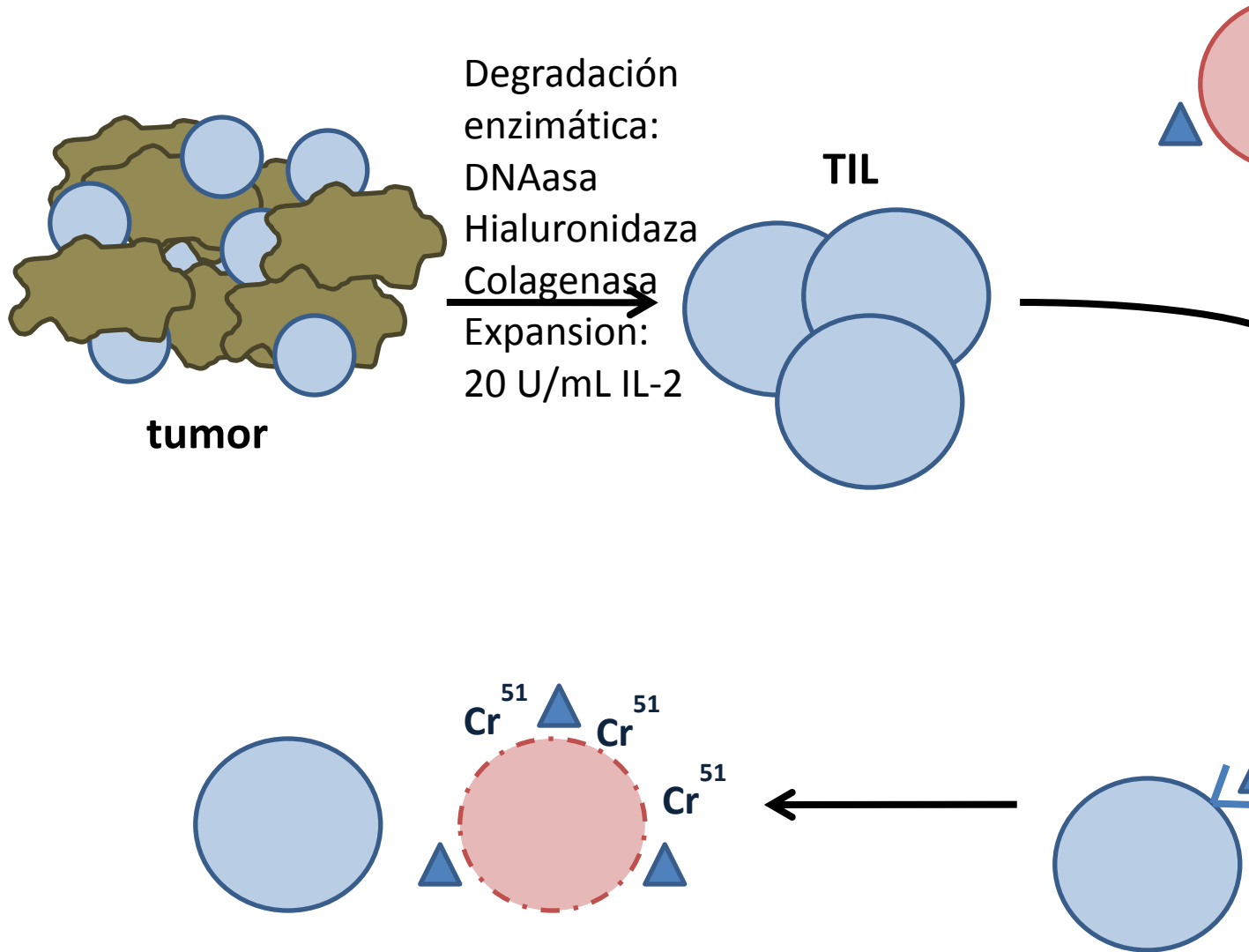


Figura 12. Esquema de la obtención de TILs a partir de biopsias frescas de tumor y evaluación de su especificidad mediante ensayo citotóxico con liberación de Cr⁵¹. Las células T2 son utilizadas como blanco, para lo cual hay que incubarlo previamente con péptidos correspondientes a antígenos tumorales, como los péptidos de MC1R, gp100, tirosinasa y Mart-1. Como control del experimento se utilizan células T2 no cargadas o cargadas con péptidos irrelevantes.

Las muestras frescas de tumor se procesan mediante degradación mecánica utilizando material quirúrgico estéril y enzimática utilizando hialuronidasa y colagenasa, que son enzimas que degradan el ácido hialurónico y el colágeno respetivamente. Luego a las células en suspensión se lavan en PBS 1X estéril, se cuentan los linfocitos y las células tumorales, y se realizan dos tipos de cultivos, uno para linfocitos y otro para células tumorales.

El cultivo para linfocitos se realiza resuspendiendo las células en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB, dejando las células a una concentración final de 2×10^6 linfocitos/ml y adicionando IL-2 que constituye un factor de activación y crecimiento para los linfocitos T. El cultivo de tumores se realiza resuspendiendo 1×10^6 células tumorales/ml y agregando ciclosporina para eliminar los linfocitos del cultivo. Así se obtiene finalmente líneas de células tumorales y de linfocitos aislados de tumor que se denominan TIL, por sus siglas en inglés *Tumor Infiltrating lymphocytes*.

Los TILs obtenidos fueron evaluados según su capacidad de reconocer células blanco cargadas exógenamente con los péptidos de MC1R. Para esto se utilizan células T2 que derivan de un híbrido de linfocitos T y B, y tienen una mutación en las proteínas TAP1 y TAP2, lo que les impide translocar péptidos al retículo endoplasmático, expresando las moléculas de MHC-I vacías en la superficie celular (Salter y cols., 1986). Al cargarlas con péptidos exógenos, en este caso los de MC1R, la molécula se estabiliza y forma lo que se denomina complejo péptido-MHC (p-MHC), que puede ser reconocido por linfocitos T CD8+ según su especificidad.

Si estas células T2 fueron cagadas previamente con ^{51}Cr , y se co-cultivan con las líneas de TIL, los Linfocitos TCD8+ que forman parte del TIL, reconocerán los péptidos de MC1R en la superficie de las células T2, lo que provocará la lisis celular mediante granzimas y perforinas que liberan los linfocitos. El ^{51}Cr se puede medir en el sobrenadante y esto da cuenta de la especificidad de las distintas líneas de TIL testeadas.

Los tres epítomos derivados de MC1R restringidos para HLA-A2 son reconocidos por TILs

Se evaluó la citotoxicidad de un panel de líneas de CTL con restricción HLA-A2, derivados de TIL contra los tres epítomos de MC1R (Tabla 3).

Cell line	MHC class I restriction	MART-1 27-35	Gp			Tyrosinase 368-376	MC1R		
			100				291- 299	283- 291	244- 252
			280- 288	457- 466	476- 485				
TIL 1206	HLA-A2	+	+	+	Nt	Nt	+	+	+
TIL 1233	HLA-A2	+	+	-	Nt	Nt	+	-	+
TIL 1218	HLA-A2	+	+	-	-	Nt	+	-	+
BL TIL	HLA-A2	-	+	+	Nt	-	+	-	+
TIL 0549	HLA-A2	-	+	Nt	Nt	-	+	+	+
MR TIL	HLA-A2	+	-	-	-	-	-	-	-
IA TIL	HLA-A2	+	-	-	-	-	-	-	-
AMK TIL	HLA-A2	+	-	-	-	Nt	-	-	-
DL TIL	HLA-A2	-	-	-	-	-	-	-	-
DF TIL	HLA-A2	-	-	-	+	-	-	-	-
CdLTIL	HLA-A2	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Resumen de las especificidades de un panel de líneas de TIL evaluadas contra péptidos de MC1R, y péptidos dominantes de melanoma con restricción HLA-A2. Se observa que aproximadamente el 50 % de los TILs estudiados reconocen alguno de los péptidos de melanoma. Por otra parte, Mart-1 es un péptido inmunodominante que se expresa en la mayoría de los pacientes con melanoma.

En principio, nuestros resultados demuestran que las líneas de TIL reconocen eficientemente líneas celulares de melanoma HLA-A2+ MC1R+ (Tabla 3 y Figura 13A) y células blanco cargadas con los péptidos derivados de MC1R (Tabla 3 y Figura 13B). Estas interacciones se bloquean eficazmente al adicionar un anticuerpo monoclonal anti-HLA-A2, confirmando la restricción HLA-A2 (Figura 13A). Además, los TIL no lisan a otras líneas celulares HLA-A2- (Figura 13A) o HLA-A2+ MC1R (-). Por ejemplo, TIL-0549 no fue capaz de lisar a la línea celular de melanoma FM3D HLA-A2+ MC1R- ni la línea celular de cáncer de colon SW480 HLA-A2+ MC1R- (Figura 13A). Más aún, los TIL no lisaron las células blanco T2, que son HLA-A2+ al no estar pulsadas con péptidos o al estar pulsadas con péptidos de control (Figura 13B). Interesantemente, al menos dos de los tres epítomos de MC1R analizados en este estudio (MC1R291 y MC1R244) fueron reconocidos al menos por el 50% de los TIL analizados (Tabla 3 y Figura 13B). El menor reconocimiento de MC1R283 en comparación con los otros péptidos podría deberse a su alta hidrofobicidad intrínseca y menor solubilidad (datos no mostrados). Más aún, también debe tenerse en cuenta que los TIL 1206 y 0549 lisaron de manera eficiente las células blanco T2 pulsadas con los tres epítomos de MC1R, mientras que el TIL 1218 solo reconoce eficientemente el péptido 291 (Figura 13B).

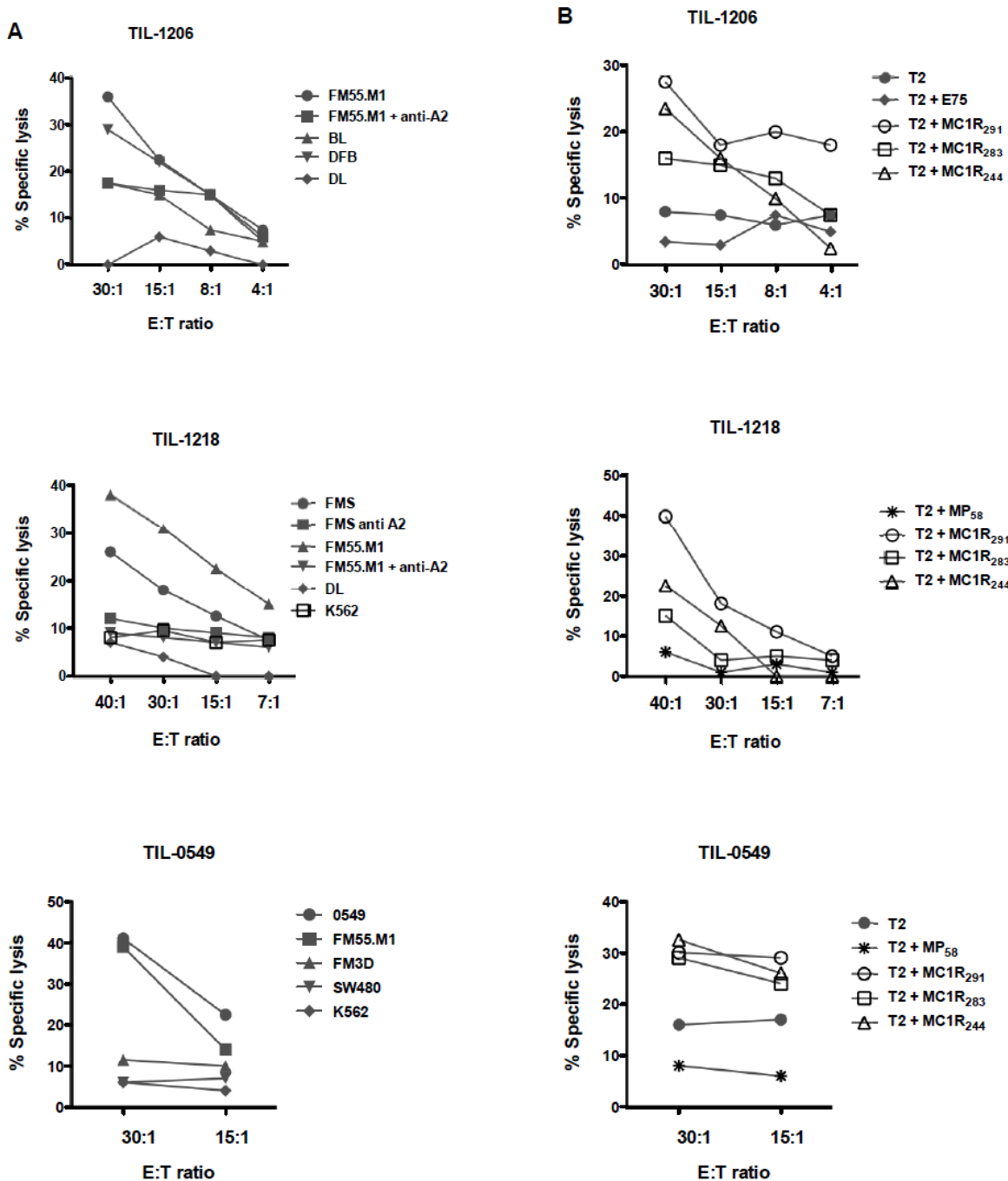


Figura 13. Las líneas de TIL reconocen de manera específica células de melanoma HLA-A2+ (A) y células T2 pulsadas con los péptidos derivados de MC1R (B). Ensayo citotóxico en el que se observa reconocimiento específico por parte de la línea de TIL 1206 de los melanomas FM55.M1 y DFB, además reconoce los tres péptidos derivados de MC1R (A y B arriba). La línea TIL 1218 reconoce específicamente la línea FM55.M1 y FMS además del péptido de MC1R 291 (A y B al medio). La línea TIL 0549 reconoce específicamente la línea de melanoma 0549 y FM55.M1 además de los tres péptidos de MC1R (A y B abajo).

Obtención de clones específicos para péptidos de MC1R

Quince clones de linfocitos T CD8 + específicas para MC1R se aislaron a partir de la línea celular TIL-1206, mediante técnicas de dilución limitante, como se esquematiza en la figura 14.

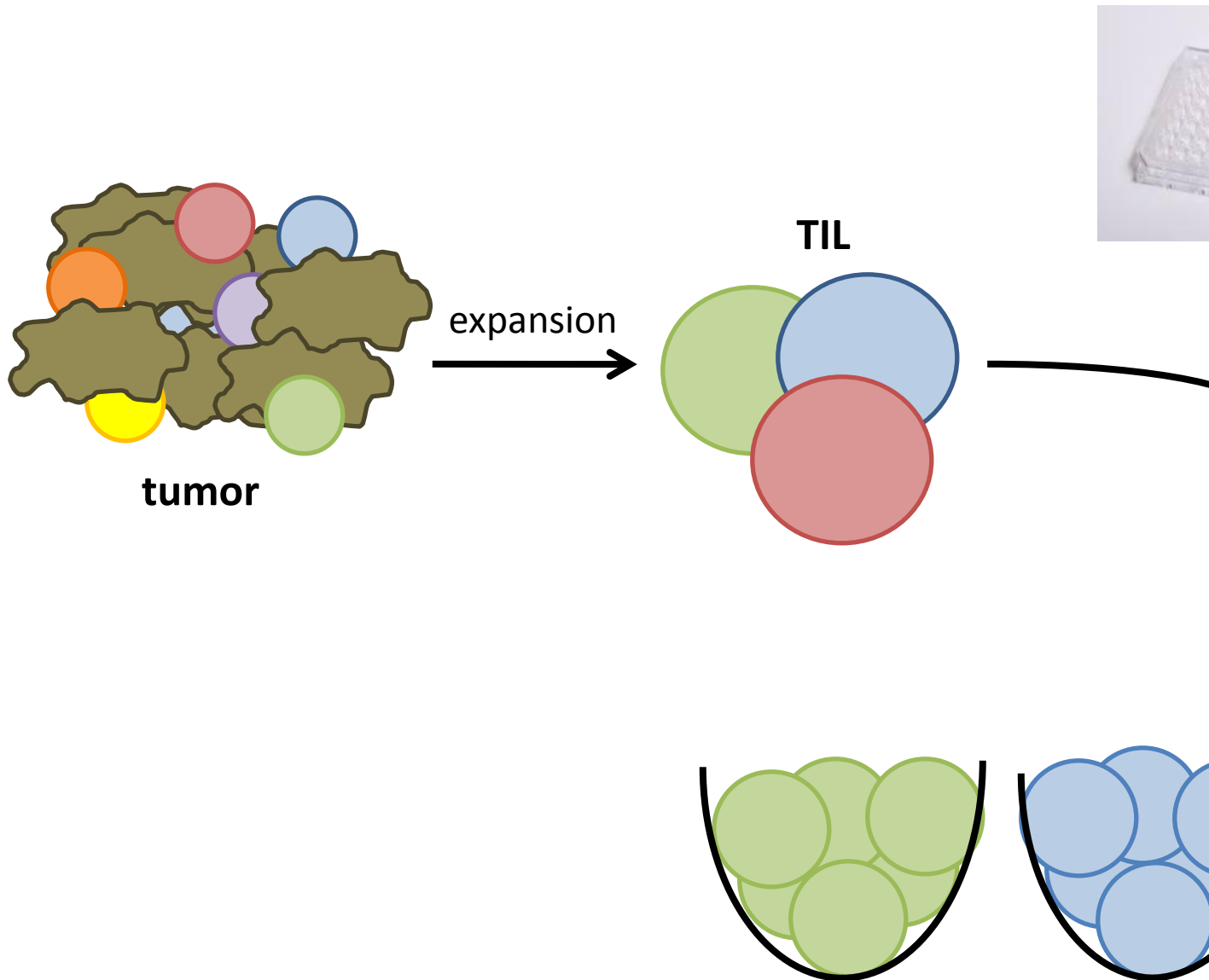


Figura 14. Esquema de la obtención de clones a partir de TILs de biopsias frescas de tumor mediante técnicas de dilución limitante. Las biopsias tumorales son procesadas como se describe anteriormente y los linfocitos obtenidos son incubados a distintas concentraciones en placas de 96 pocillos conteniendo *feeders* (Materiales y métodos). Cuando en menos del 36% de los pocillos de una placa se observa crecimiento de linfocitos, éstos se pueden considerar clones.

Luego los clones obtenidos fueron expandidos en grandes cantidades y testeados según su capacidad de reconocer células T2 pulsadas con distintos péptidos derivados de antígenos de melanoma, como se muestra en la figura 15.

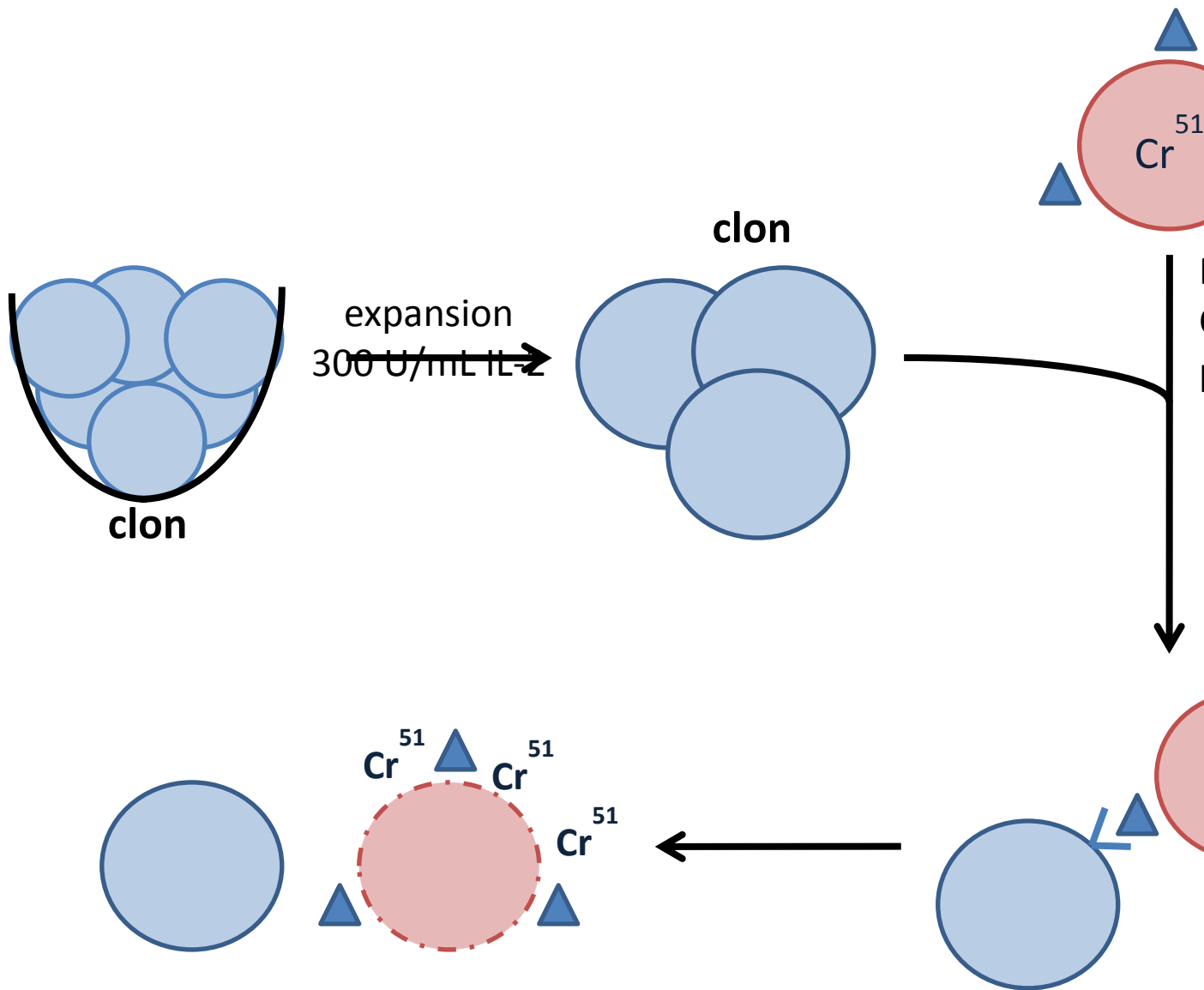


Figura 15. Esquema de la expansión de los clones de MC1R obtenidos mediante la técnica de dilución limitante, y posterior prueba de especificidad mediante ensayo citotóxico con liberación de Cr^{51} . Los clones de linfocitos obtenidos son expandidos y posteriormente enfrentados a células blanco que pueden ser células T2 cargadas con cromo radioactivo y pulsadas con distintos péptidos de melanoma para ver cuál de ellos es reconocido específicamente por cada clon obtenido.

Tres de los quince clones de células T; N3, N4 y N9 reconocieron de manera eficiente las células blanco HLA-A2+, T2 cargadas exógenamente con el péptido MC1R 244 (Figura 16).

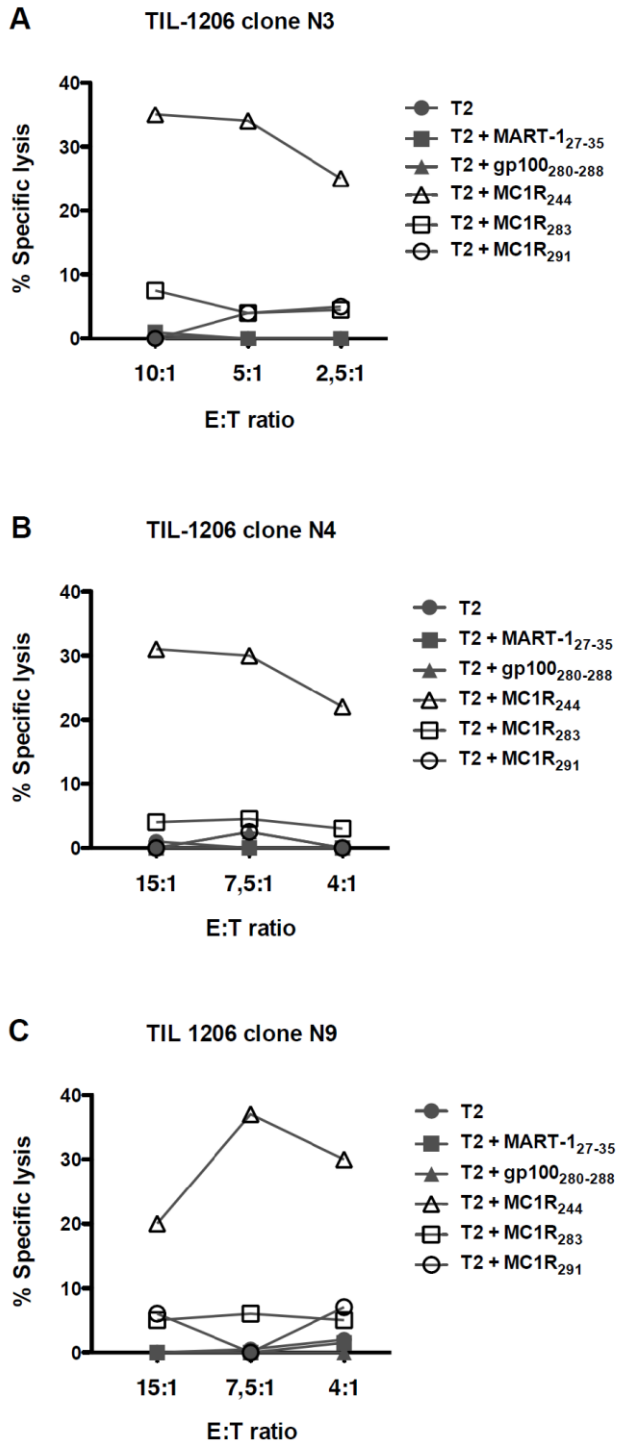


Figura 16. Tres de quince clones aislados a partir del TIL 1206, resultaron ser específicos para el péptido MC1R244. No reconocen otros péptidos utilizados como control. Los clones específicos para MC1R 244 se denominaron N3 (A), N4 (B) y N9 (C). Todos ellos reconocen células T2 pulsadas sólo el péptido MC1R 244 y no reconocen otros péptidos.

Por el contrario no reconocieron las células T2 no cargadas o células T2 cargadas con péptidos de control. Los otros doce clones no mostraron especificidad para alguno de los péptidos de MC1R (datos no mostrados).

Estudio de TILs con tetrámeros

Se determinó la presencia de linfocitos T CD8+ específicos para MC1R291 en poblaciones de TIL de biopsias de pacientes con melanoma usando tetrámeros HLA-A2/MC1R291 tal como se esquematiza en la figura 17.

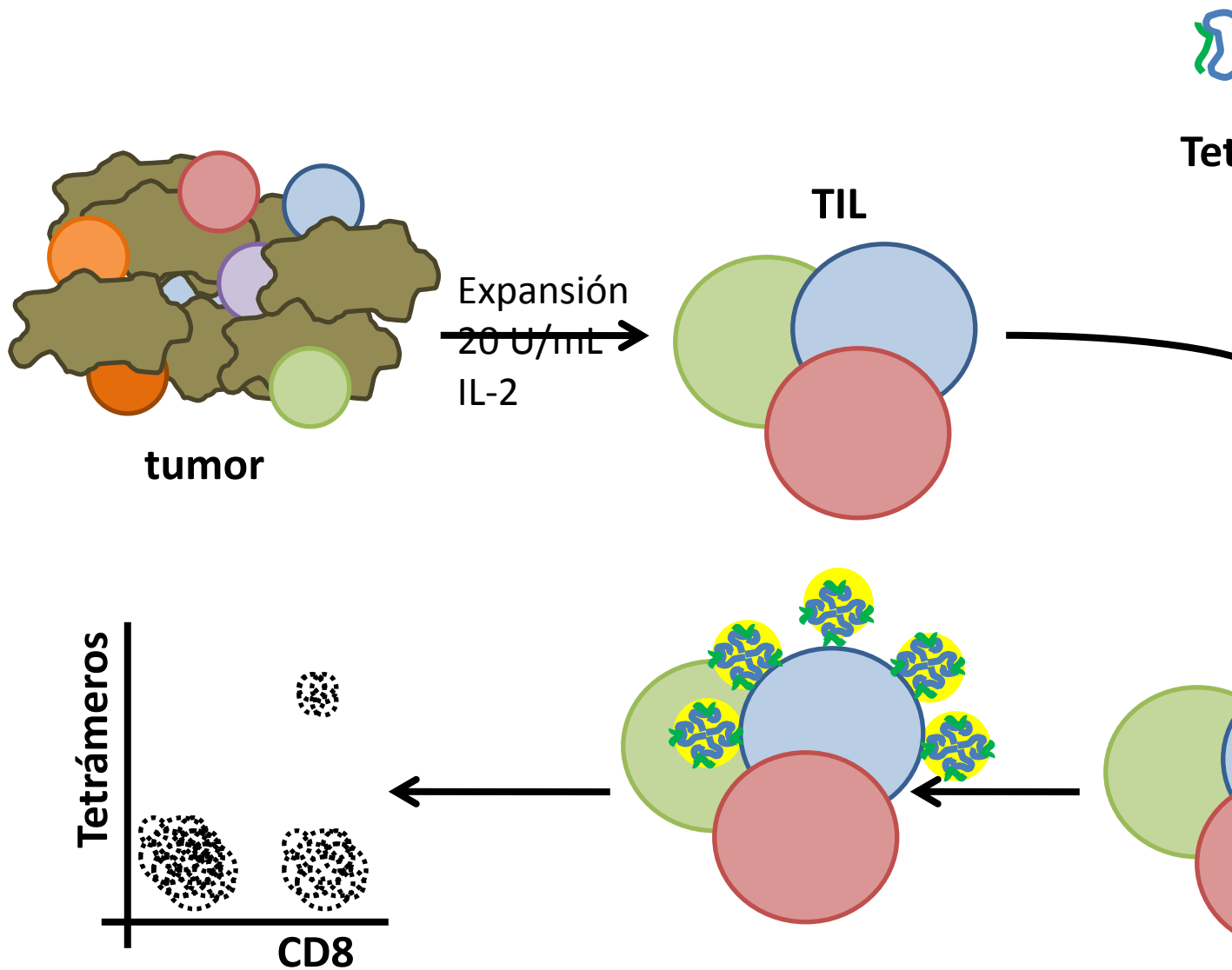


Figura 17. Esquema de detección de poblaciones de linfocitos específicos para los péptidos de MC1R 291 y 244 a partir de TILs de biopsias frescas de tumor, utilizando tetrámeros y posterior análisis mediante citometría de flujo. Los tetrámeros fueron fabricados con los péptidos MC1R 244 y 291 y conjugados con fluoróforos específicos. Si un linfocito de una población heterogénea como

es el TIL es afin por uno de los péptidos de MC1R, el tetrámero se va a unir a él con cierta analogía a como lo hace un anticuerpo por su molécula blanco, y de esta forma la emisión de fluorescencia va a separar la población de linfocitos específicos del resto de las células del TIL.

En efecto, se identificaron poblaciones de células CD8+ específicas para HLA-A2/MC1R291 en los TIL de tres pacientes diferentes (Figura 18A). Curiosamente, las frecuencias de células CD8+ MC1R291-positivas en las líneas analizadas fueron más altos que para el epítipo MART-1, que por lo general se considera como dominante y con mayor afinidad por la molécula HLA-A2 al compararlo con cualquiera de los epítipos de MC1R. Es importante destacar que TILs de la muestra Pt3 reconocen los tres epítipos, incluyendo HLA-A2/MC1R244 (Figura 18).

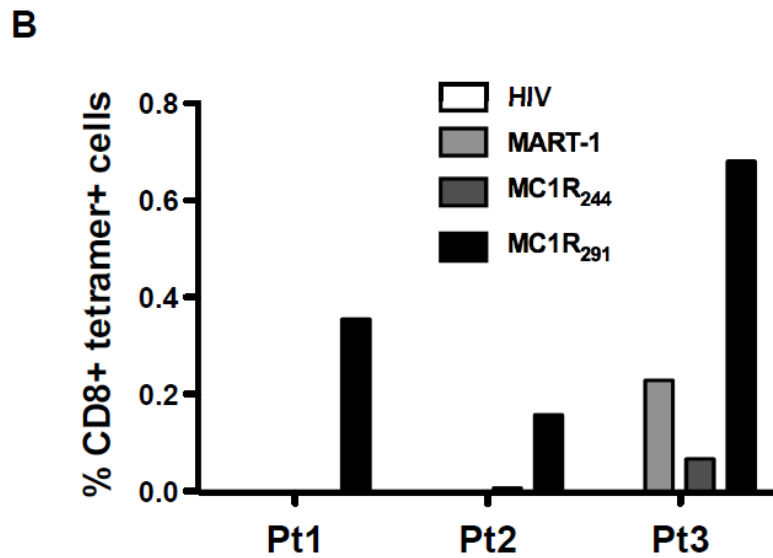
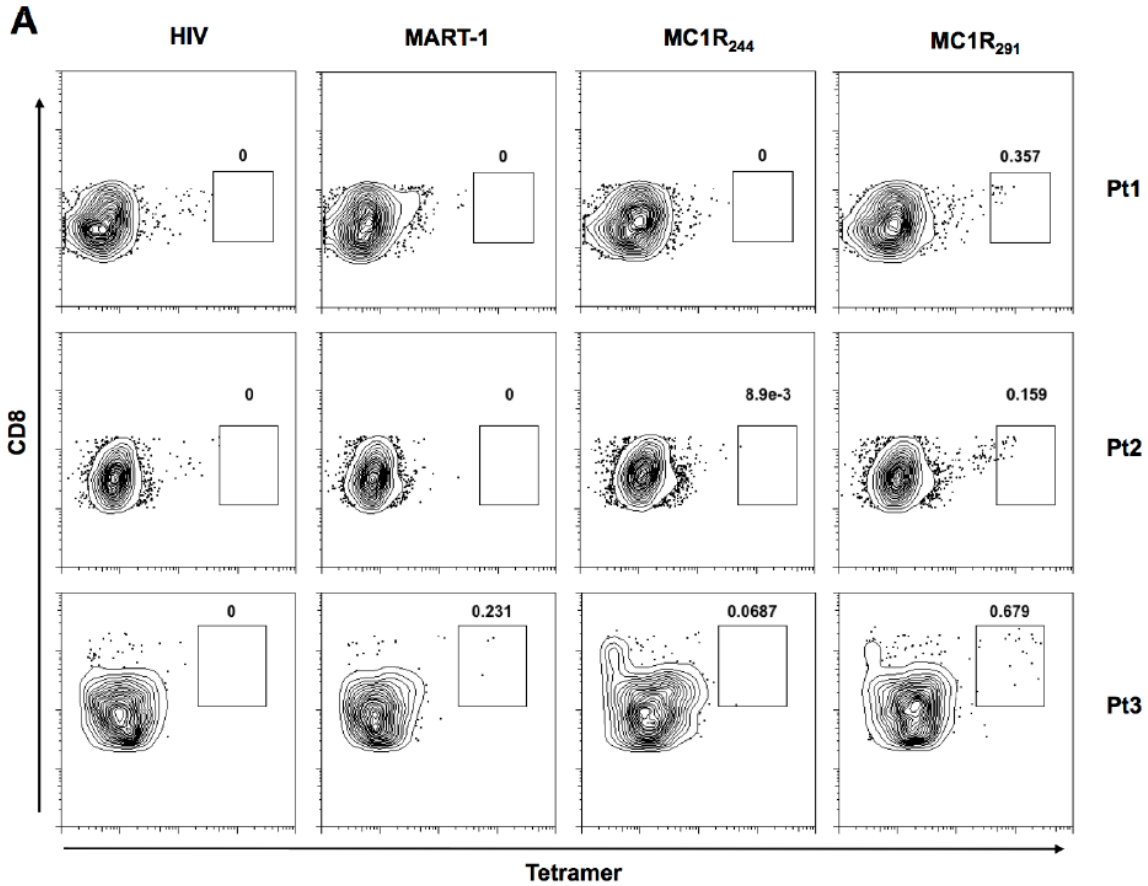


Figura 18. Identificación de poblaciones de linfocitos T CD8+ específicos mediante tetrámeros. Los TIL Pt1, Pt2 y Pt3 fueron teñidos con tetrámeros HLA-A2/MC1R291, HLA-A2/MC1R244 y HLA-A2/Mart-1 (A). También se muestran los mismos resultados graficados (B). Los tres TIL testeados muestran una marcación positiva para el tetrámero MC1R/291, mientras que el TIL Pt3 además muestra positividad para Mart-1.

La baja solubilidad de MC1R283 no nos permitió producir complejos de MHC lo suficientemente estables para la tetramerización, lo que nos impide evaluar la presencia de linfocitos T CD8+ específicos para HLA-A2/MC1R283 en biopsias de melanoma. Esto está en línea con nuestras observaciones anteriores de que muchos TIL no reconocen MC1R283 en el mismo grado que MC1R291 o MC1R244.

Inducción de líneas de linfocitos T citotóxicos con los péptidos nativos de MC1R (244, 283 y 291) en sangre donantes normales y de pacientes con melanoma HLA-A*0201

Usando PBMC de donantes sanos, demostramos previamente que tres epítotos hidrófobicos nonamericos derivados de MC1R de afinidad intermedia por la molécula HLA-A2 inducen la activación de CTL específicos que reconocen dichos péptidos -MC1R244, MC1R283 y MC1R291- en la superficie de células T2 o células C1R transfectadas con el gen que codifica para la molécula HLA-A2 (Salazar-Onfray y cols., 1997). Con el fin de evaluar si los PBMC de pacientes con melanoma maligno (MM) también contenían precursores de CTL dirigidos contra estos tres epítotos de MC1R, se indujeron líneas de CTL a partir de PBMC de cinco pacientes con melanoma HLA-A2+ usando DC autólogas cargadas con péptido, tal como se esquematiza en la figura 19.

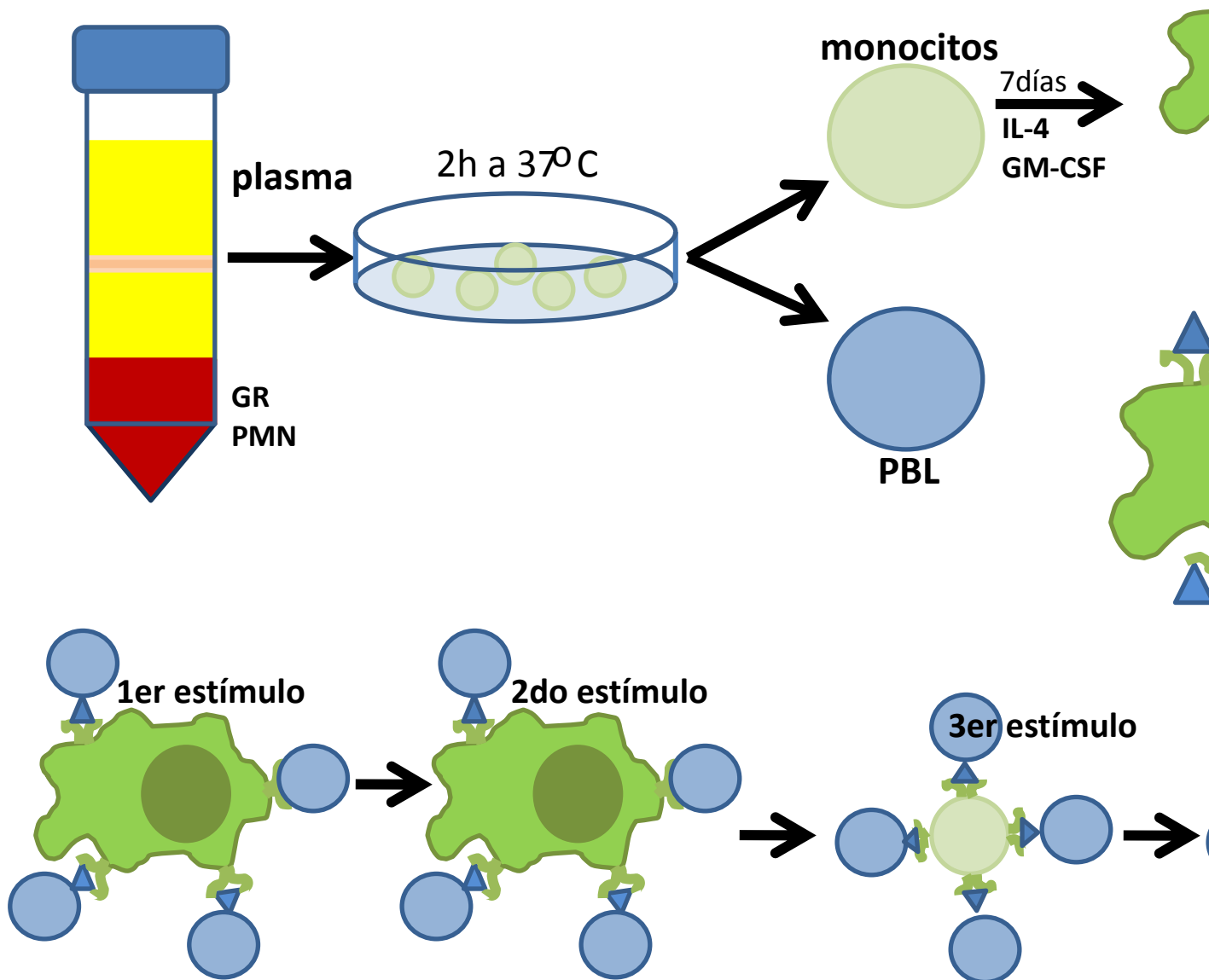


Figura 19. Esquema del protocolo utilizado para generar líneas de linfocitos T citotóxicos a partir de sangre de pacientes con melanoma y donantes normales. La sangre completa sometida a separación por gradiente con ficol (Materiales y métodos) obteniendo una banda de células que corresponden a linfocitos de sangre periférica (PBL) y monocitos. Mediante su capacidad de adherirse al plástico, los monocitos son separados del PBL y se incuban por 7 días en presencia de GM-CSF e IL-4 para obtener células dendríticas inmaduras. Luego se incuban las células en presencia de un cóctel de citoquinas por 2 días y las últimas 4 horas en presencia además del péptido correspondiente a MC1R (244, 291 o 283). Estas células ya maduras y pulsadas con péptidos se utilizan para estimular los linfocitos del PBL congelados el día 0, y luego de 4 estimulaciones separadas por 10 días cada una y las últimas 2 con monocitos autólogos, se obtienen líneas de linfocitos que son testeados para ver si reconocen el respectivo péptido con el cual fueron estimulados.

Posterior a las 4 estimulaciones, se enriqueció la población de linfocitos T CD8+ mediante selección positiva usando microbeads. Luego las células se testearon según su capacidad de reconocer el mismo péptido con el cual fueron estimuladas sobre la superficie de células T2 o C1RA2 mediante un ensayo de EliSpot para IFN- γ .

En una primera instancia se aplicó este protocolo en 2 donantes sanos para luego utilizarlo en pacientes con melanoma. Los péptidos derivados de MC1R son capaces de generar líneas de linfocitos T CD8+ que reconocen de manera específica los mismos péptidos con los cuales fueron estimuladas, así para el donante 1 se generaron 4 líneas de linfocitos T CD8+ utilizando los péptidos Mart-1, MC1R244, MC1R283 y MC1R291. Luego de completar el protocolo descrito anteriormente se testeó la especificidad de las 4 líneas mediante la capacidad de secretar específicamente IFN- γ (figura 20).

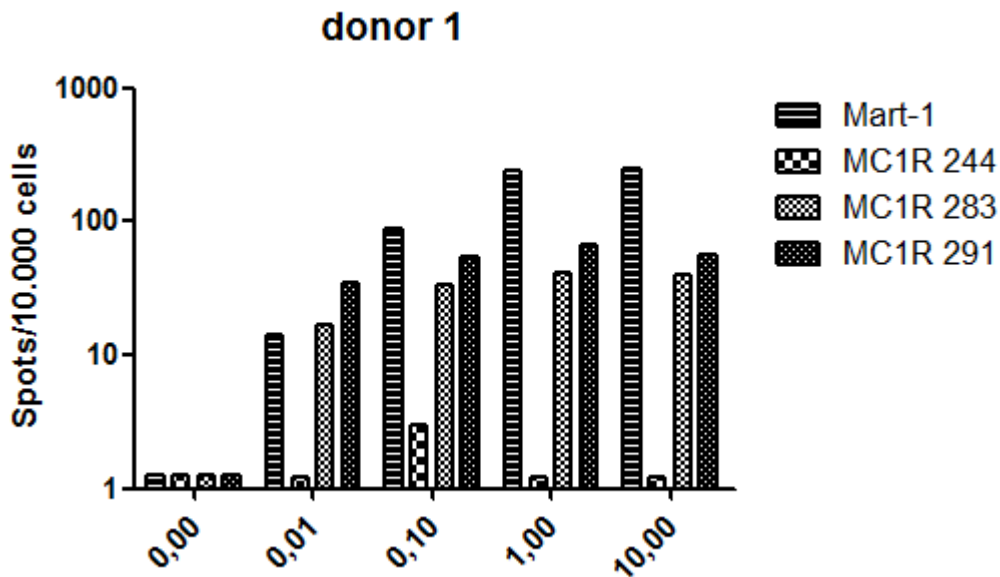


Figura 20. Especificidad de las líneas generadas a partir del donante 1 mediante ensayo de Elispot. Los péptidos de MC1R 283 y 291 son capaces de generar líneas de linfocitos T CD8+ específicos luego de 4 estimulaciones sucesivas con los respectivos péptidos. Con el péptido MC1R244 no se logró generar linfocitos específicos para el donante 1. Como control positivo se utilizó el péptido de melanoma Mart-1.

Al utilizar sangre total del donante 2 que también es HLA-A2+, se logró obtener líneas de linfocitos T CD8+ para uno de dos péptidos utilizados. El péptido MC1R291 funcionó al igual que el donante 1, mientras que el péptido MC1R244 no funcionó de la misma forma (Figura 21).

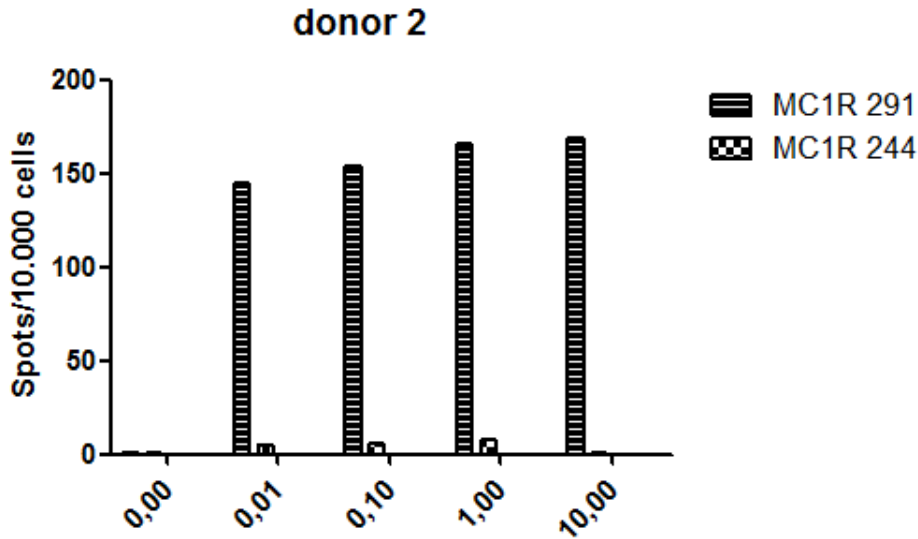


Figura 21. Especificidad de las líneas generadas a partir del donante 2 mediante ensayo de EliSpot. La línea estimulada con el péptido MC1R 291 resultó ser específica para el mismo péptido ya que genera linfocitos que reconocen de manera específica el mismo péptido en la superficie de células T2 y este reconocimiento es dependiente de dosis de péptido utilizado en el ensayo. No se obtuvo el mismo resultado con el péptido MC1R 244.

Ahora al utilizar sangre periférica de pacientes con melanoma observamos que por lo menos dos líneas de CTL específicas se obtuvieron para cada paciente al estimular el respectivo PBMC con los péptidos de MC1R. Los tres epítomos de MC1R inducen actividad CTL específica contra las células blanco HLA-A2+ pulsadas con el mismo péptido de MC1R (Figura 22 A-C). Curiosamente, la amplitud de las respuestas de CTL fue comparable a la provocada por péptidos HLA-A2 dominantes tales como el MAA gp100₂₈₀₋₂₈₈ o el péptido derivado del virus de la gripe MP₅₈₋₆₆ (Figura 22 D-E). Es importante destacar que ninguna de las líneas de CTL específicas para MC1R reconocen células blanco no pulsadas, ni células blanco pulsadas con péptidos irrelevantes (Figura 22 A-C).

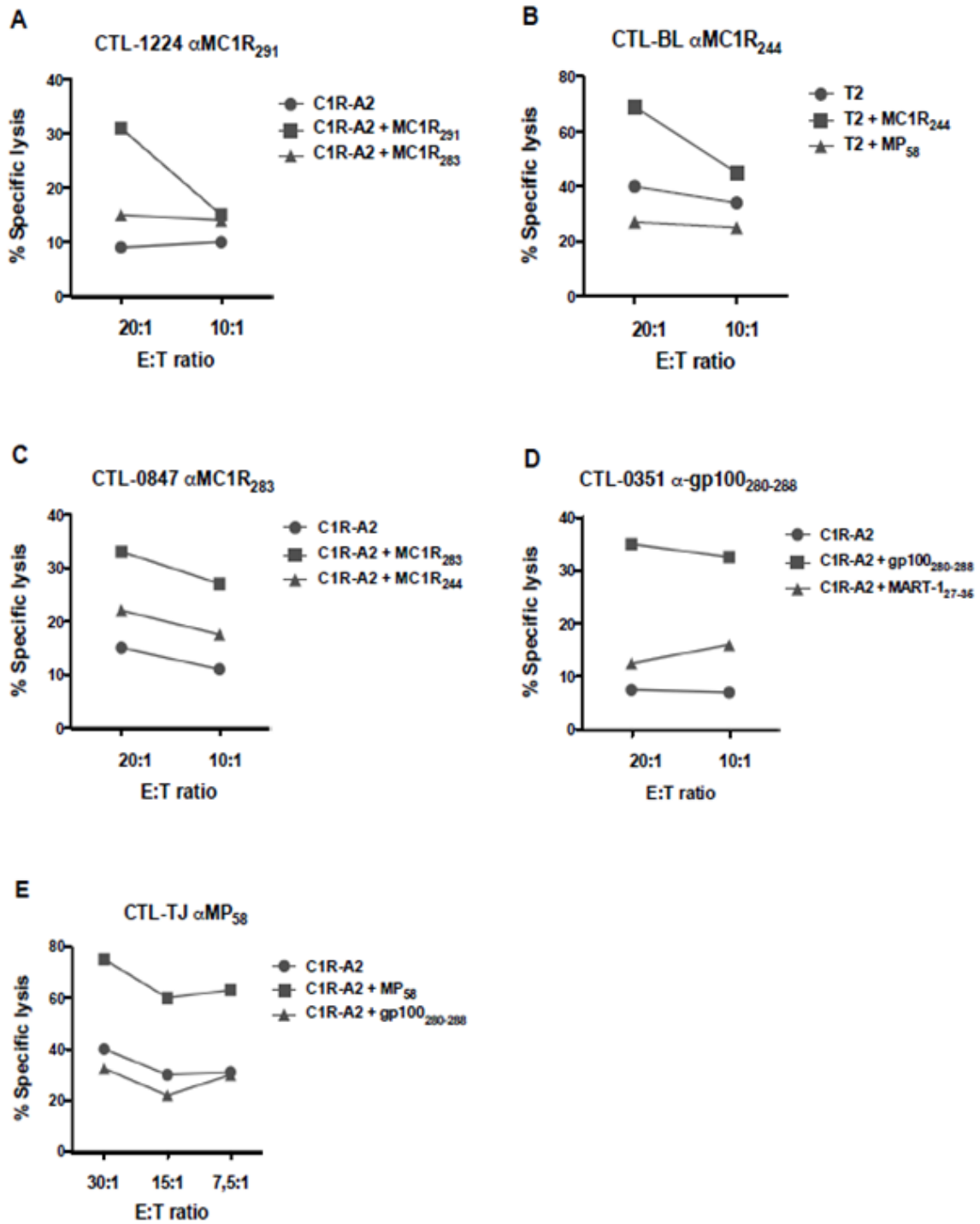


Figura 22. Linfocitos de pacientes con melanoma estimulados con los péptidos de MC1R reconocen específicamente células blanco pulsadas con los péptidos relevantes. La línea CTL 1224 estimulada con el péptido MC1R 291 es capaz de lisar células C1RA2 pulsadas con el mismo péptido y no reconoce de manera específica el péptido MC1R 283 utilizado en este caso como control ni las células C1RA2 sin péptido (A). La línea CTL BL anti-MC1R 244 reconoce de manera

específica el péptido 244 y no reconoce el péptido MP58 (control) ni las células C1RA2 sin péptido (B). La línea CTL 0847 anti-MC1R 283 reconoce y lisa de manera específica células C1RA2 plasmadas con el péptido 283 y no reconoce células C1RA2 con el péptido 244 (control) ni sin péptido (C). Como control positivo se muestran dos líneas que fueron estimuladas con el péptido de melanoma gp100 y el péptido de influenza MP58 (D y E).

Los tres epítomos derivados de MC1R: MC1R244, MC1R283 y MC1R291, son procesados y presentados naturalmente por las células del melanoma basándose en la capacidad de los CTL inducidos, de lisar melanomas HLA-A2+ (Salazar-Onfray y cols., 1997). Aquí, las líneas de CTL derivadas del paciente con MM BL, y estimuladas con cada uno de los péptidos de MC1R, lisan de manera eficiente las células BL de melanoma autólogas así como también líneas celulares de melanoma HLA-A2+ MC1R+ como DFB, DFW y FMS (Figura 16 A-C). Por el contrario, la línea de células de melanoma HLA-A2- MC1R+ AK no fue reconocida por ninguno de los CTL inducidos con los péptidos derivados de melanoma (Figura 23 A-C). Además, los CTL específicos para MC1R no lisan la línea de carcinoma de colon SW480, células HLA-A2+ MC1R-, o las líneas de células de carcinoma de ovario OVA3507 (Figura 23 A-C). Otro dato interesante es que todas las líneas de melanoma HLA-A2+ testeadas también fueron lisadas específicamente por líneas de CTL inducidas con el péptido gp100₂₈₀₋₂₈₈ con amplitudes de respuesta similares en comparación con las líneas de CTL específicos inducidos con los péptidos derivados de MC1R (Figura 23 D). Por el contrario, una línea de CTL específica para HLA-A2+/MP₅₈₋₆₆ no pudo lisar la mayoría de las líneas celulares de melanoma testeadas y se muestra a lo sumo, una lisis marginal de algunas de las líneas celulares de melanoma (Figura 23 E). También hay que señalar que el reconocimiento específico relativamente bajo de la lisis de la línea celular FMS obtenidos con el péptido MC1R283 al compararlos con la línea CTL inducida con el péptido MP₅₈₋₆₆ (Figura 23 C y E), podría explicarse por su hidrofobicidad sustancialmente más alta y por lo tanto baja solubilidad en comparación con los otros dos péptidos de MC1R, así como también de los péptidos gp100₂₈₀₋₂₈₈ y MP₅₈₋₆₆. Además, la insolubilidad de MC1R283 impidió la producción de tetrámeros de HLA-A2 con este péptido.

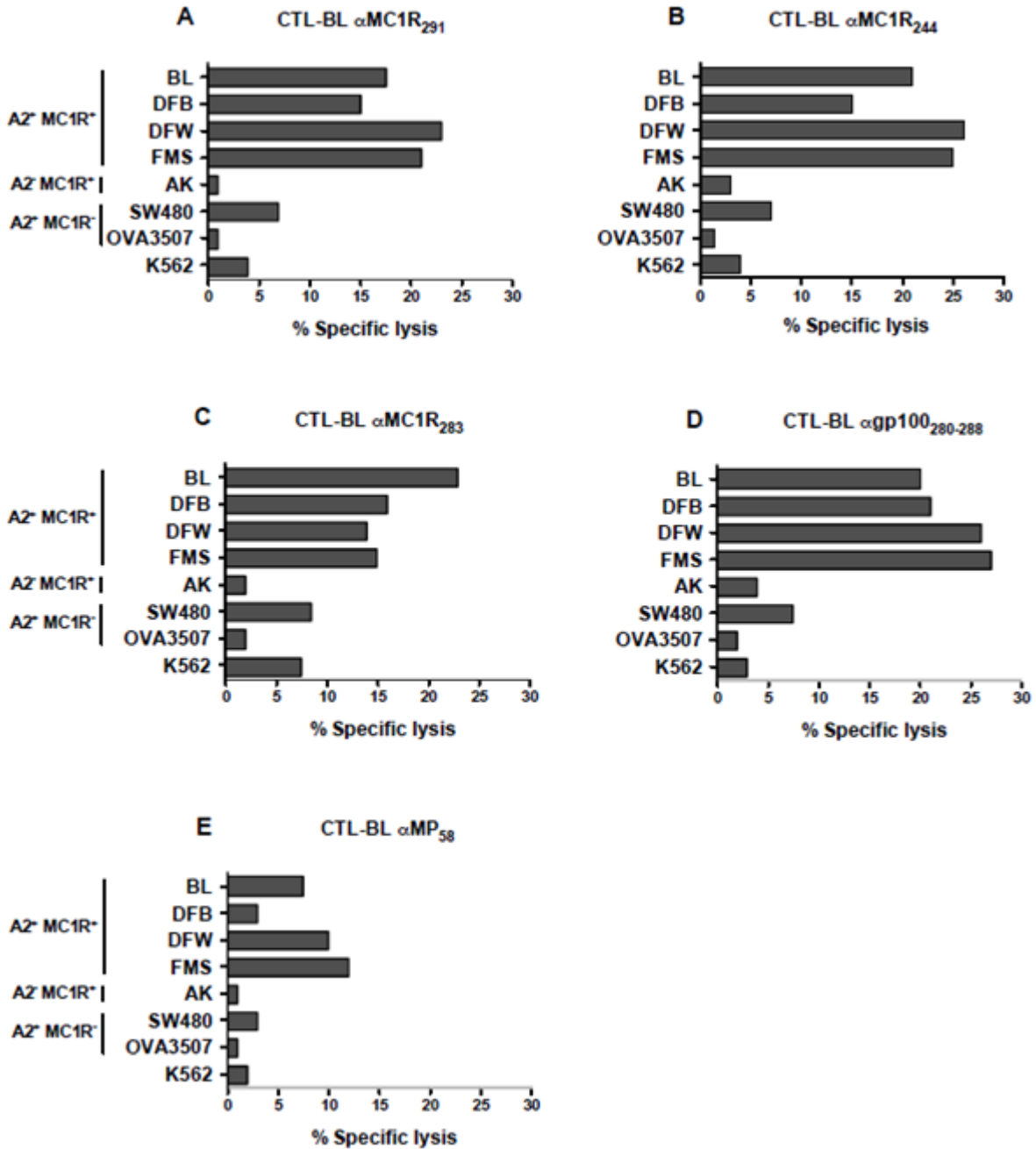


Figura 23. Las líneas de melanoma expresan naturalmente los péptidos derivados de MC1R, ya que son capaces de ser lisadas por las líneas de CTL inducidas con estos péptidos. Líneas derivadas del paciente BL y estimuladas con los distintos péptidos de MC1R (A - C) reconocen de manera específica líneas de melanoma HLA-A2+ MC1R+. Como control positivo se utilizó el péptido gp100 para estimular linfocitos del mismo paciente BL, y se probó si reconocen el mismo panel de melanomas (D). Como control negativo la línea inducida con el péptido MP58 (derivado de influenza) también del paciente BL, fue enfrentada a las líneas de melanoma descritas.

En resumen, hasta ahora nuestros resultados demuestran que las líneas de CTL específicas para MC1R obtenidas a partir de PBMC de pacientes con melanoma, lisan específicamente células

blanco HLA-A2+ cargadas con péptidos de MC1R, así como también líneas celulares de melanoma HLA -A2+ MC1R +, tan eficientemente como la respuesta a péptidos derivados de MAA con restricción HLA-A2, dominantes como gp100₂₈₀₋₂₈₈.

Péptidos modificados derivados de MC1R y su capacidad de inducir CTL específicos en donantes normales

Nos propusimos entonces aumentar la afinidad de los péptidos derivados de MC1R haciendo modificaciones claves en algunos aminoácidos. A partir del péptido MC1R291 sintetizamos variantes (Tabla 4).

Péptido	Secuencia	1Y	9V	YV
MC1R 291	AIIDPLIYA	YIIDPLIYA	AIIDPLIYV	YIIDPLIYV

Tabla 4. Secuencia del péptido natural de MC1R291 y con modificaciones aminoacídicas que teóricamente aumentarían la afinidad por la molécula HLA-A2.

Posteriormente probamos la estabilidad del complejo p-MHC1 utilizando células T2, las cuales se incubaron por 4 horas con los distintos péptidos modificados y luego se midió la expresión de la molécula HLA-A2 a distintos tiempos post-incubación, mediante citometría de flujo, lo que estaría en directa relación con la cantidad de complejos p-MHC en la superficie de las células. Todas las variantes sintetizadas tienen mejor estabilidad que el péptido original (Figura 24).

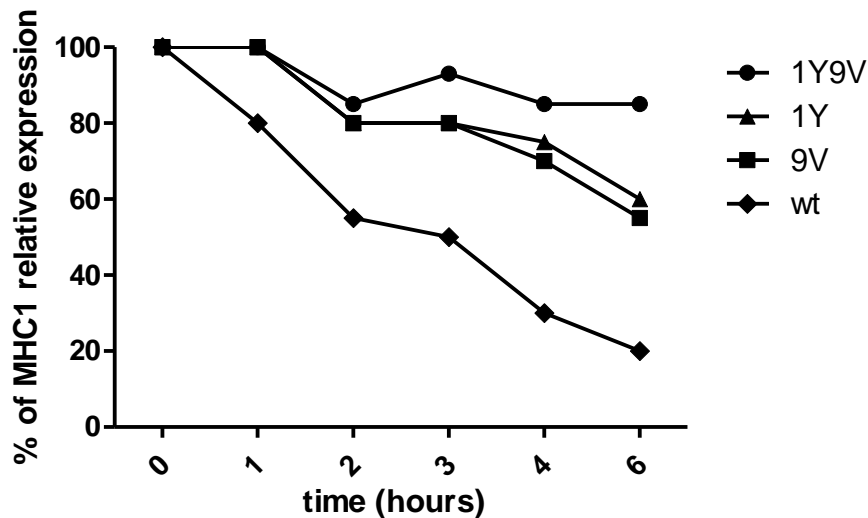



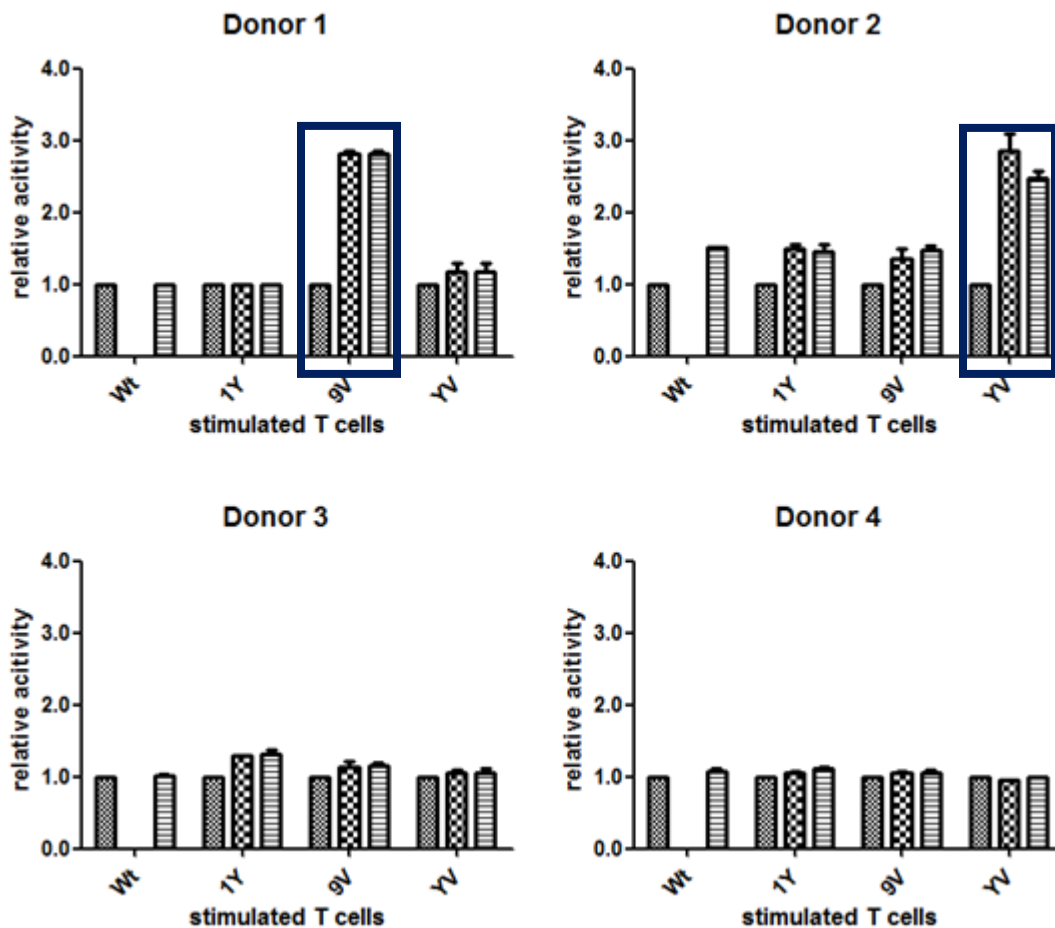


Figura 24. Estabilidad de los péptidos modificados derivados de MC1R291. Luego de incubar durante 4 horas las células T2 con un exceso de los respectivos péptidos, las células se lavaron y se midió la expresión relativa de la molécula MHC-I HLA-A2 cada 1 hora por 6 horas. Se observa que mientras decae rápidamente la expresión del complejo p-MHC en células T2 incubadas con el

péptido wt de MC1R, los péptidos modificados otorgan mayor estabilidad al complejo por lo que el decaimiento es menor.

El siguiente paso fue comprobar si utilizando estos pépticos modificados se pueden inducir linfocitos T CD8 a partir de PBMC de sangre de donantes normales. Se siguió con el protocolo descrito en materiales y métodos y figura 19. Se utilizó PBMC de 10 donantes HLA-A2+ y se estimularon con los distintos péptidos modificados derivados de MC1R 291. Luego de 4 estimulaciones, las células fueron cosechadas y testeadas mediante un ensayo de Elispot, en el cual se incubaron células T2 con el péptido relevante, es decir el mismo péptido modificado con el cual las células fueron estimuladas, y con el péptido original MC1R 291 ya que es este péptido el que se presenta en la superficie de melanomas en el contexto MHC-I, no así los péptidos modificados, que en este ensayo sirven sólo como una manera de inducir linfocitos, y educarlos para que finalmente reconozcan el péptido original de MC1R (Figura 25).

-  LT+T2 alone
-  LT+T2+Modified peptide
-  LT+T2+WT peptide



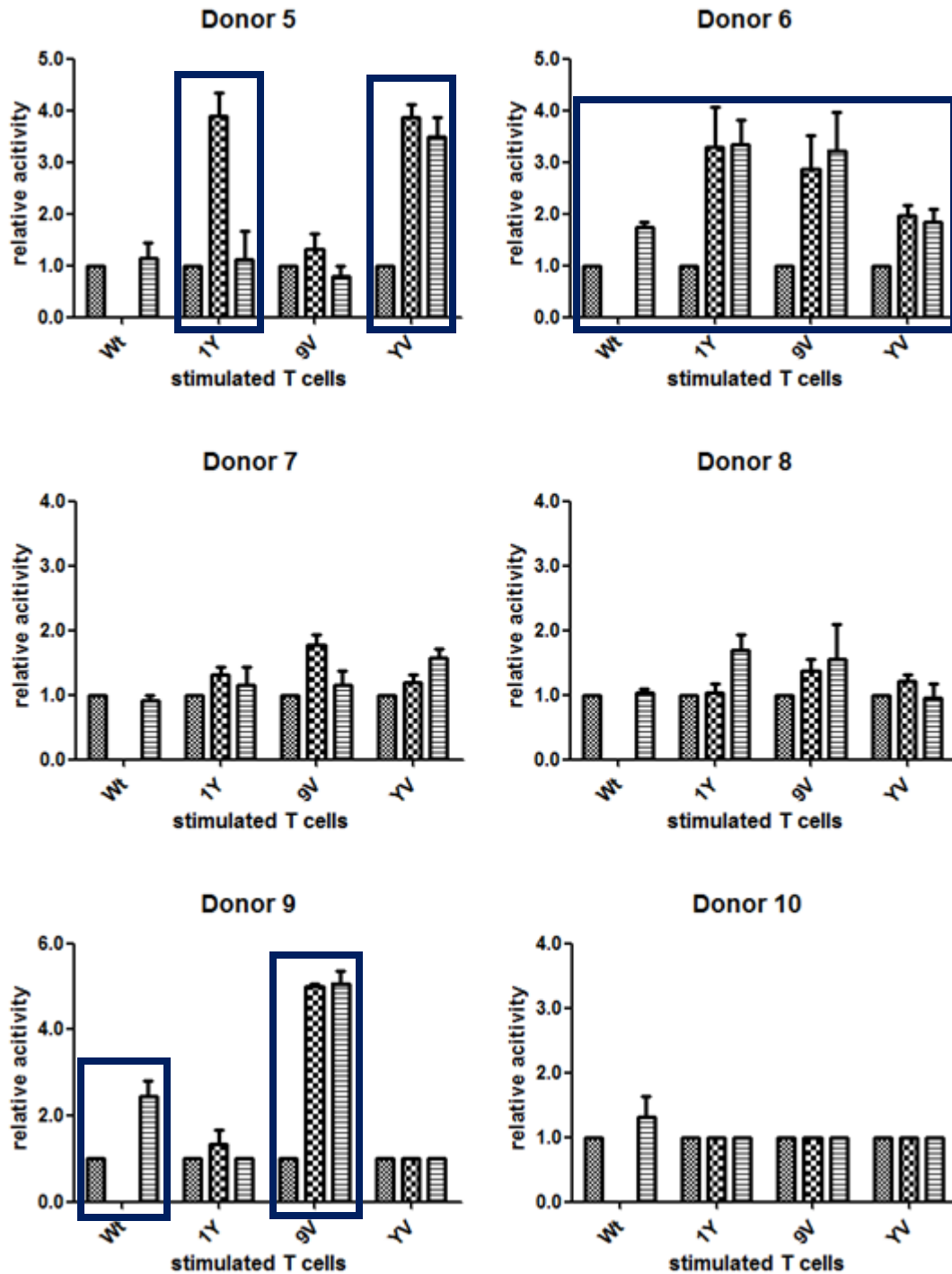


Figura 18. La estimulación de linfocitos con los péptidos modificados derivados de MC1R genera CTL específicos que también reconocen el péptido wt en la superficie de células blanco. Se estimularon linfocitos provenientes de PBMC de 10 donantes distintos con los distintos péptidos modificados derivados de MC1R 291 incluido el péptido wt. Luego de 4 estimulaciones, se

enriqueció la población de linfocitos T CD8+ y se midió la capacidad de reconocer el péptido original de MC1R, así como también el mismo péptido con el cual fueron estimulados sobre la superficie de células T2, mediante un ensayo de Elispot. Se cuantificaron los puntos mediante un lector de placas de Elispot y se normalizaron los resultados con respecto al valor obtenido para el control. Se enmarca en azul las líneas que fueron consideradas específicas por presentar significativamente más puntos que el control correspondiente a células T2 sin péptido.

En la figura 9, se aprecia que que los linfocitos estimulados con los péptidos modificados derivados de MC1R291 funcionan de manera distinta según el donante estudiado. En azul se encuadran las líneas de CTL fueron consideradas específicas según el análisis estadístico utilizado. Para el donante 1 solo el péptido 9V es capaz de inducir linfocitos específicos que reconocen además el péptido wt. Para el donante 2 sólo el péptido YV genera linfocitos específicos que reconocen además el péptido wt. Para el donante 6, todos los péptidos incluido el péptido wt genera linfocitos T específicos, mientras que para los donantes 3, 4, 7, 8 y 10 no se logró generar linfocitos específicos con ningún péptido derivado de MC1R 291. Más interesante aún, se observa que la línea de CTL del donante 5 estimulada con el péptido 1Y reconoce sólo el péptido 1Y en la superficie de células T2 y no al péptido original de MC1R, es decir no hay reactividad cruzada, lo cual es explicable, debido a que los complejos p-MHC del los péptidos 1Y y wt no son exactamente iguales y puede cambiar su estructura tridimensional en ciertas zonas. Además del mismo donante 5 la línea YV resultó ser específica para dicho péptido y reacciona cruzadamente con el péptido wt. Finalmente, del donante 9 se obtuvieron líneas específicas estimulando con los péptidos wt y 9V.

Analizando este mismo resultado desde otro punto de vista, vemos que tanto los péptidos 9V como YV funcionan en 3 de 10 líneas estimuladas, mientras que el péptido wt y el péptido 1Y funcionan en 2 de 10 líneas, según la capacidad de reconocer el péptido wt.

Lo relevante de esto es que demostramos que es posible obtener líneas específicas para un péptido como lo es MC1R 291 estimulando con un péptido modificado aún cuando el mismo péptido original no fe capaz de hacerlo, lo que mejora sustancialmente el rendimiento al generar líneas específicas, ya que del 50% de los donantes obtuvimos al menos una línea específica, mientras que si hubiésemos utilizado sólo el péptido original de MC1R lo hubiésemos logrado solo en 2 de 10 líneas.

CONCLUSIONES

Demostramos la presencia de linfocitos T citotóxicos específicos para MC1R infiltrando tumores de pacientes con melanoma, lo que demuestra que naturalmente se expresan péptidos derivados de MC1R en melanomas generando linfocitos que reconocen estos péptidos en el contexto MHC-I presentados por tumores autólogos como el caso de 0549 así como también tumores alogénicos que expresan HLA-A2 y MC1R.

Más aún, al menos el 50% de las líneas de linfocitos infiltrantes de tumor estudiadas reconocen algún péptido de MC1R y aparentemente esto estaría también relacionado al reconocimiento de gp100, ya que vimos que la mayoría de las líneas que reconocen gp100 también reconocen MC1R y viceversa.

La presencia de linfocitos T específicos para MC1R fue demostrada a nivel clonal, obteniendo clones de linfocitos específicos para el péptido MC1R244. Además se estudió mediante la utilización de tetrameros la presencia de linfocitos anti-MC1R en TILs de biopsias frescas de tumor.

Tanto en donantes normales como en pacientes con melanoma se logró inducir líneas de CTL que reconocen los péptidos de MC1R en la superficie de células presentadoras, utilizando los péptidos nativos de MC1R. Además generamos péptidos modificados con afinidad aumentada por la molécula HLA-A2 y los evaluamos según su capacidad de generar una respuesta CTL específica *in vitro* en donantes normales. Todas las modificaciones aminoacídicas realizadas al péptido MC1R 291, incrementan la estabilidad del complejo p-MHC I, pero no demostraron ser significativamente más inmunogénicos que el péptido original de MC1R ya que tanto el péptido 9V como el YV funcionaron el 3 de 10 donantes, mientras que el péptido wt y el 1Y lo hicieron en 2 de 10 donantes lo que demuestra que no es suficiente con aumentar la afinidad por la molécula MHC-I, sino que además es necesario que el donante cuente con un repertorio de linfocitos T vírgenes adecuado para reconocer, activarse y expandirse y frente al estímulo otorgado por los péptidos modificados. Más aún, se demuestra que no todos los donantes responden de la misma manera frente a los distintos péptidos, lo que apoya el hecho de que cada individuo cuenta con un repertorio de linfocitos T vírgenes propio y no necesariamente dos individuos responden de la misma forma frente a la estimulación con un antígeno en particular.

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la presencia de linfocitos T CD8+ específicos para MC1R en TIL provenientes de biopsias de pacientes con melanoma. Además, clones T CD8+ derivados de estos TIL, reconocen eficientemente células cargadas con péptidos derivados de MC1R. También demostramos la existencia de precursores de células T CD8 + específicas para MC1R en PBMC de pacientes y que los tres péptidos estudiados derivados de MC1R son inmunogénicos. Además, nuestros resultados indican que la capacidad de los péptidos derivados de MC1R para inducir CTL anti-melanoma específicos *in vitro* es similar a péptidos más inmunogénicos de cáncer y virus bien

establecidos, como gp100₂₈₀₋₂₈₈ y MP₅₈₋₆₆ respectivamente. Estos datos proporcionan soporte para el potencial uso de estos epítomos para inmunoterapias, basadas en péptido, DC o linfocitos T para la lucha contra el melanoma.

Nuestros resultados también confirmaron que células de melanoma HLA-A2+ MC1R + presentan naturalmente los tres epítomos de MC1R que hemos descrito previamente (Salazar-Onfray y cols., 1997), lo que resulta en el reconocimiento específico por TIL y líneas CTL derivadas de pacientes con melanoma. Sorprendentemente, la existencia natural en poblaciones de TIL de CTL específicos anti-MC1R demuestra que estos linfocitos no son eliminados por los mecanismos de selección en el timo. Se ha descrito sobre el mantenimiento de linfocitos T con baja reactividad a auto péptidos durante la selección tímica, proporcionando a linfocitos T vírgenes con TCR señales tónicas que promueven la supervivencia periférica a largo plazo (Sprent y Surh, 2011). A pesar del hecho de que las células T sufren un proceso de desensibilización del TCR después de la selección positiva (Sprent y Surh, 2011), los linfocitos T vírgenes de alta avidéz y alto poder de proliferación específicos contra epítomos MC1R podrían ser reclutados y educados para inducir una potente actividad anti-melanoma (Thornwall y cols., 1997; Xia y cols., 1996).

La proteína MC1R está sobreexpresada en líneas celulares de melanoma y en la mayoría de los tejidos de melanoma frescos, incluyendo melanoma uveal (López y cols., 2007; Salazar-Onfray y cols., 2002). En contraste, se detectaron niveles más bajos de expresión en los tejidos normales, incluyendo la glándula suprarrenal, cerebelo, placenta, hígado, así también como monocitos, macrófagos y DC estimulada *in vitro* (Salazar-Onfray y cols., 2002; Thornwall y cols., 1997). Por lo tanto los niveles de expresión de la proteína MC1R en diferentes tejidos pueden permitir la presentación diferencial de epítomos peptídicos que podrían ser reconocidos como anómalos por el sistema inmune. Por otra parte, el uso potencial del concepto de epítomos peptídicos superpuestos (Melief y van der Burg, 2008) puede asegurar que las DC estimulan a linfocitos T CD8+ y células T CD4+ helper, lo que resulta en respuestas inmunes antitumorales más fuertes y eficaces como se ha demostrado previamente para los antígenos P53 en el cáncer de ovario y de colon (Leffers y cols., 2009; Speetjens y col., 2009).

El presente estudio describe la inducción de CTL específicos anti-MC1R a partir de PBMC HLA-A2+ de pacientes con melanoma avanzado etapa IV, utilizando estímulos seriados con APC autólogas cargadas con los tres epítomos derivados de MC1R con restricción HLA-A2. Por otra parte, los CTL específicos de MC1R reconocen células blanco cargadas con los tres péptidos de MC1R, así como también células tumorales MC1R+, lo que demuestra la especificidad para melanoma con restricción HLA-A2. Esta capacidad para desencadenar la respuesta de CTL se ha demostrado previamente para epítomos dominantes, pero más recientemente para péptidos de baja afinidad por la molécula HLA-A2 (Gross y cols., 2004; Kawakami y cols., 1994c; Vonderheide y cols., 2004). Los niveles de reconocimiento relativamente más bajos obtenidos con el péptido MC1R283 podrían ser explicadas por su hidrofobicidad sustancialmente más alta y por lo tanto peor solubilidad en comparación con los otros dos péptidos de MC1R.

Los epítomos derivados de MC1R complementan estudios anteriores reportados sobre la reactividad específica de los CTL anti-melanoma derivadas de TIL, que demuestran el predominio de los epítomos derivados de MART-1 y gp100 (Kawakami y cols., 1994c; Sakai y cols., 1997). En este sentido, el uso de péptidos derivados de MC1R podría aumentar el repertorio total de linfocitos T CD8+ anti-melanoma, lo que a su vez podría mejorar significativamente la eficacia y la previsibilidad de los tratamientos actuales. De hecho, también se ha reportado actividad de linfocitos T específicos contra MC1R que aparece después de vacunar con péptidos polivalentes para melanoma (Reynolds y cols., 1998) y otros autores han asociado reacciones de vitiligo con la presencia de células T CD8+ de baja avidéz específicos para MC1R en un paciente con melanoma (Wankowicz-Kalinska y cols., 2006). Esto es relevante teniendo en cuenta los resultados de Kvistborg y colaboradores describieron cómo la reactividad de las células T anti-melanoma, detectada en TIL *in vitro* puede predecir la reactividad antitumoral y eficacia después de ser expandidas y transferidas adoptivamente en pacientes (Kvistborg y cols., 2012). Por otra parte, recientes ensayos clínicos en fase I y II han obtenido resultados favorables con un protocolo de vacunación que incluía la administración de péptidos modificados y nativos de baja afinidad derivados de telomerasa TERT572 en pacientes con tumores sólidos (Mavroudis y cols., 2006; Vetsika y cols., 2012). Además, los avances en el diseño de péptidos modificados agonistas han demostrado la capacidad para potenciar la inmunogenicidad e inducir respuestas CTL efectivas antitumorales (van Stipdonk y cols., 2009). Si bien estos métodos son prometedores, queda por verse si los péptidos derivados de MC1R modificados pueden generar respuestas CTL MC1R específicas de mayor alcance en comparación con los epítomos nativos.

Más aún, comprobamos de manera sistemática, que al utilizar péptidos modificados derivados de uno de estos antígenos de MC1R, con la afinidad aumentada por la molécula MHC-I, no necesariamente aumenta la capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos con respecto al antígeno original, y que la respuesta es variable según el repertorio de linfocitos T vírgenes de cada donante estudiado, habiendo incluso donantes que reaccionan mejor con el péptido original (de afinidad relativa más baja) que con los péptidos modificados.

Sin embargo es destacable que para muchos donantes con los que el péptido original de MC1R 291 no sirvió para generar CTL específicos, al menos alguno de los péptidos modificados si lo hizo, aumentando el rendimiento de 2 de 10 (al utilizar sólo el péptido nativo) a 5 de 10 (al utilizar todos los péptidos). Esto nos dirige inmediatamente a muchas preguntas acerca de la existencia de linfocitos capaces de reconocer un determinado antígeno autólogo. ¿Acaso éstos linfocitos están siempre presentes y necesitan sólo del estímulo adecuado para desarrollarse? ¿Este estímulo puede provenir de un antígeno diferente para luego reaccionar cruzadamente contra el antígeno autólogo? ¿Podría ser ésta la explicación del desarrollo de muchas enfermedades autoinmunes? ¿Existirá un estímulo adecuado para tener actividad anti-MC1R para los donantes en los cuales ninguno de los péptidos resultó ser inmunogénico? ¿Se podrá romper la tolerancia hacia antígenos propios de una forma más sistematizada y eficaz?

En conclusión, nuestro estudio indica que todos los epítomos derivados de MC1R, tanto los péptidos nativos (244, 283 y 291) como los péptidos modificados derivados de MC1R 291 (1Y, 9V

e YV) son antígenos asociados a melanoma útiles capaces de inducir CTL específicos tanto en donantes sanos como en pacientes con melanoma por lo que pueden ser considerados en el desarrollo futuro de la inmunoterapia contra el melanoma.

REFERENCIAS

Adema GJ, de Boer AJ, Vogel AM, Loenen WA, Figdor CG. Molecular characterization of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. *J Biol Chem*. 1994 Aug 5;269(31):20126-33.

Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, González FE, Ramírez M, Reyes D, Pereda C, Hevia D, García T, Salazar L, Ferreira A, Hermoso M, Mendoza-Naranjo A, Ferrada C, Garrido P, López MN, Salazar-Onfray F. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 15;17(8):2474-83

Alanio C, Lemaitre F, Law HK, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood*. 2010 May 6;115(18):3718-25

Allerbring EB, Duru AD, Uchtenhagen H, Madhurantakam C, Tomek MB, Grimm S, Mazumdar PA, Friemann R, Uhlin M, Sandalova T, Nygren PA, Achour A. Unexpected T-cell recognition of an altered peptide ligand is driven by reversed thermodynamics. *Eur J Immunol*. 2012 Nov;42(11):2990-3000

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009 20;27(36):6199-206

Balsari A, Marolda R, Gambacorti-Passerini C, Sciorelli G, Tona G, Cosulich E, Taramelli D, Fossati G, Parmiani G, Cascinelli N. Systemic administration of autologous, alloactivated helper-enriched lymphocytes to patients with metastatic melanoma of the lung. A phase I study. *Cancer Immunol Immunother*. 1986;21(2):148-55

Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zang J, Ibrahim PN, Cho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KY, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Lyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K. Clinical efficacy of RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010 30;467(7315):596-9

Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993 178: 489-95

Chen YT, Stockert E, Tsang S, Coplan KA, Old LJ. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 92: 8125-29

Chhajlani V, Wikberg JE. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 1992 309: 417-20

Cibotti R, Kanellopoulos JM, Cabaniols JP, Halle-Panenko O, Kosmatopoulos K, Sercarz E, Kourilsky P. Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jan 1;89(1):416-20

Colella TA, Bullock TN, Russell LB, Mullins DW, Overwijk WW, Luckey CJ, Pierce RA, Restifo NP, Engelhard VH. Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy. *J Exp Med* 2000 191: 1221-1232

Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, Renauld JC, Boon T. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1994 180: 35-42

Díaz-Torné C1, de Juana Ortiz MA, Geli C, Cantó E, Laiz A, Corominas H, Casademont J, de Llobet JM, Juárez C, Díaz-López C, Vidal S. Rituximab-induced IL-15 reduction associated with clinical improvement in rheumatoid arthritis. *Immunology*. 2013 Nov 12

Escobar A, López M, Serrano A, Ramirez M, Pérez C, Aguirre A, González R, Alfaro J, Larrondo M, Fodor M, Ferrada C, Salazar-Onfray F. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol*. 2005 Dec;142(3):555-68

Gibney GT, Zager JS. Clinical development of dabrafenib in BRAF mutant melanoma and other malignancies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013 Jul;9(7):893-9

Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Bennaceur-Griscelli A, Faure O, Guillaume P, Firat H, Chouaib S, Lemonnier FA, Davoust J, Miconnet I, Vonderheide RH, Kosmatopoulos K. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2004 113: 425-433

Grossmann ME, Davila T, Celis T. Avoiding tolerance against prostatic antigens with subdominant peptide epitopes. *J Immunother*. 2001 24: 237-241

Hernandez J, Lee PP, Davis MM, Sherman LA. The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire. *J Immunol*. 2000 164: 596-602

Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev*. 2014 Jan;257(1):56-71

Huang Y-H, Terabe M, Pendleton CD, Stewart Khursigara D, Bera TK, Pastan I, Berzofsky JA Identification and Enhancement of HLA-A2.1-Restricted CTL Epitopes in a New Human Cancer Antigen-POTE. *PLoS One*. 2013 Jun 4;8(6)

Hwang S, Song KD, Lesourne R, Lee J, Pinkhasov J, Li L, El-Khoury D, Love PE. Reduced TCR signaling potential impairs negative selection but does not result in autoimmune disease. *J Exp Med*. 2012 209(10):1781-95

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994(a) 91: 3515-19

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR, Adema GJ, Miki T, Rosenberg SA. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994(b) 91: 6458-62

Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, Appella E, Rosenberg SA. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1994(c) 180: 347-352

Knutson KL, Schiffman K, Cheever MA, Disis ML (2002) Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. *Clin Cancer Res* 8: 1014-1018

Kvistborg P, Shu CJ, Heemskerk B, Fankhauser M, Thruw CA, Toebe M, van Rooij N, Linnemann C, van Buuren MM, Urbanus JH, Beltman JB, Thor Straten P, Li YF, Robbins PF, Besser MJ, Schachter J, Kenter GG, Dudley ME, Rosenberg SA, Haanen JB, Hadrup SR, Schumacher TN (2012) TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8(+) T cell compartment in melanoma patients. *Oncoimmunology* 1: 409-418

Leffers N, Lambeck AJ, Gooden MJ, Hoogeboom BN, Wolf R, Hamming IE, Hepkema BG, Willems PH, Molmans BH, Hollema H, Drijfhout JW, Sluiter WJ, Valentijn AR, Fathers LM, Oostendorp J, van der Zee AG, Melief CJ, van der Burg SH, Daemen T, Nijman HW (2009) Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial. *Int J Cancer* 125: 2104-2113

Legoux F, Debeaupuis E, Echasserieau K, De La Salle H, Saulquin X, Bonneville M (2010) Impact of TCR reactivity and HLA phenotype on naive CD8 T cell frequency in humans. *J Immunol* 184: 6731-6738

Lopez MN, Pereda C, Ramirez M, Mendoza-Naranjo A, Serrano A, Ferreira A, Poblete R, Kalergis AM, Kiessling R, Salazar-Onfray F (2007) Melanocortin 1 receptor is expressed by uveal malignant melanoma and can be considered a new target for diagnosis and immunotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 1219-1227

Lopez MN, Pereda C, Segal G, Munoz L, Aguilera R, González FE, Escobar A, Ginesta A, Reyes D, Gonzalez R, Mendoza-Naranjo A, Larrondo M, Compan A, Ferrada C, Salazar-Onfray F (2009) Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *J Clin Oncol* 27: 945-952

Mavroudis D, Bolonakis I, Cornet S, Myllaki G, Kanellou P, Kotsakis A, Galanis A, Nikoloudi I, Spyropoulou M, Menez J, Miconnet I, Niniraki M, Cordopatis P, Kosmatopoulos K, Georgoulas V (2006) A phase I study of the optimized cryptic peptide TERT(572y) in patients with advanced malignancies. *Oncology* 70: 306-314

Melief CJ, van der Burg SH (2008) Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 8: 351-360

Michaelsson J, Achour A, Salcedo M, Kase-Sjostrom A, Sundback J, Harris RA, Karre K (2000) Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers. *Eur J Immunol* 30: 300-307

Palucka K, Banchereau J (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 12: 265-277

Parkhurst MR, Riley JP, Igarashi T, Li Y, Robbins PF, Rosenberg SA (2004) Immunization of patients with the hTERT : 540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase. *Clin Cancer Res* 10: 4688-4698

Parkhurst MR, Salgaller ML, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Rosenberg SA, Kawakami Y (1996) Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J Immunol* 157: 2539-2548

Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12: 269-281

Reynolds SR, Celis E, Sette A, Oratz R, Shapiro RL, Johnston D, Fotino M, Bystryrn JC (1998) HLA-independent heterogeneity of CD8+ T cell responses to MAGE-3, Melan-A/MART-1, gp100, tyrosinase, MC1R, and TRP-2 in vaccine-treated melanoma patients. *J Immunol* 161: 6970-6976

Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, Pavlov D, Bulanahgui CA, Millham R, Comin-Anduix B, Reuben JM, Seja E, Parker CA, Sharma A, Glaspy JA, Gomez-Navarro J. Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 10;23(35):8968-77

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4: 321-327

Ruppert J, Sidney J, Celis E, Kubo RT, Grey HM, Sette A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*. 1993 Sep 10;74(5):929-37

Sakai C, Kawakami Y, Law LW, Furumura M, Hearing VJ, Jr. (1997) Melanosomal proteins as melanoma-specific immune targets. *Melanoma Res* 7: 83-95

Salazar-Onfray F, Lopez M, Lundqvist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A, Korenblit C, Petersson M, Chhajlani V, Larsson O, Kiessling R (2002) Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer* 87: 414-422

Salazar-Onfray F, Nakazawa T, Chhajlani V, Petersson M, Karre K, Masucci G, Celis E, Sette A, Southwood S, Appella E, Kiessling R (1997) Synthetic peptides derived from the melanocyte-stimulating hormone receptor MC1R can stimulate HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes that recognize naturally processed peptides on human melanoma cells. *Cancer Res* 57: 4348-4355

Salter RD, Cresswell P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J.* 1986 May;5(5):943-9.

Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Bröcker EB, Grabbe S, Rittgen W, Edler L, Sucker A, Zimpfer-Rechner C, Berger T, Kamarashev J, Burg G, Jonuleit H, Tüttenberg A, Becker JC, Keikavoussi P, Kämpgen E, Schuler G; DC study group of the DeCOG. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol.* 2006 Apr;17(4):563-70. Epub 2006 Jan 17.

Schaed SG, Klimek VM, Panageas KS, Musselli CM, Butterworth L, Hwu WJ, Livingston PO, Williams L, Lewis JJ, Houghton AN, Chapman PB (2002) T-cell responses against tyrosinase 368-376(370D) peptide in HLA*A0201+ melanoma patients: randomized trial comparing incomplete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and QS-21 as immunological adjuvants. *Clin Cancer Res* 8: 967-972

Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, Maecker B, Schultze JL, Hodi FS, Soiffer RJ, Jung K, Kuroda MJ, Letvin NL, Greenfield EA, Mihm M, Kutok JL, Dranoff G (2003) Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3398-3403

Slingluff CL, Jr., Yamshchikov G, Neese P, Galavotti H, Eastham S, Engelhard VH, Kittlesen D, Deacon D, Hibbitts S, Grosh WW, Petroni G, Cohen R, Wiernasz C, Patterson JW, Conway BP, Ross WG (2001) Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes. *Clin Cancer Res* 7: 3012-3024

Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD (2006) Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90: 1-50

Speetjens FM, Kuppen PJ, Welters MJ, Essahsah F, Voet van den Brink AM, Lantrua MG, Valentijn AR, Oostendorp J, Fathers LM, Nijman HW, Drijfhout JW, van de Velde CJ, Melief CJ, van der Burg SH (2009) Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15: 1086-1095

Sprent J, Surh CD (2011) Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol* 12: 478-484

Tatro JB, Atkins M, Mier JW, Hardarson S, Wolfe H, Smith T, Entwistle ML, Reichlin S (1990) Melanotropin receptors demonstrated in situ in human melanoma. *J Clin Invest* 85: 1825-1832

Thornwall M, Dimitriou A, Xu X, Larsson E, Chhajlani V (1997) Immunohistochemical detection of the melanocortin 1 receptor in human testis, ovary and placenta using specific monoclonal antibody. *Horm Res* 48: 215-218

Tourdot S, Scardino A, Saloustrou E, Gross DA, Pascolo S, Cordopatis P, Lemonnier FA, Kosmatopoulos K. A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur J Immunol*. 2000 Dec;30(12):3411-21.

Valmori D, Fonteneau JF, Lizana CM, Gervois N, Lienard D, Rimoldi D, Jongeneel V, Jotereau F, Cerottini JC, Romero P (1998) Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160: 1750-1758

Van Der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T (2002) Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 188: 51-64

van Stipdonk MJ, Badia-Martinez D, Sluijter M, Offringa R, van Hall T, Achour A (2009) Design of agonistic altered peptides for the robust induction of CTL directed towards H-2Db in complex with the melanoma-associated epitope gp100. *Cancer Res* 69: 7784-7792

Vetsika EK, Konsolakis G, Aggouraki D, Kotsakis A, Papadimitraki E, Christou S, Menez-Jamet J, Kosmatopoulos K, Georgoulas V, Mavroudis D (2012) Immunological responses in cancer patients after vaccination with the therapeutic telomerase-specific vaccine Vx-001. *Cancer Immunol Immunother* 61: 157-168

Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM (2004) Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10: 828-839

Wankowicz-Kalinska A, Mailliard RB, Olson K, Graham F, Edington H, Kirkwood JM, Martinek S, Das PK, Storkus WJ (2006) Accumulation of low-avidity anti-melanocortin receptor 1 (anti-MC1R) CD8+ T cells in the lesional skin of a patient with melanoma-related depigmentation. *Melanoma Res* 16: 165-174

Wenandy L, Sorensen RB, Sengelov L, Svane IM, Thor Straten P, Andersen MH (2008) The immunogenicity of the hTERT540-548 peptide in cancer. *Clin Cancer Res* 14: 4-7

Winder A, Kobayashi T, Tsukamoto K, Urabe K, Aroca P, Kameyama K, Hearing VJ (1994) The tyrosinase gene family--interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis. *Cell Mol Biol Res* 40: 613-626

Xia Y, Muceniece R, Wikberg JE (1996) Immunological localisation of melanocortin 1 receptor on the cell surface of WM266-4 human melanoma cells. *Cancer Lett* 98: 157-162

PUBLICACIONES GENERADAS

En directa relación con el tema de tesis

González FE¹, Ramírez M¹, Allerbring EB, Fasching N, Lundqvist A, Poschke I, Achour A², Salazar-Onfray F². **Melanocortin 1 Receptor-derived peptides are efficiently recognized by cytotoxic T lymphocytes from melanoma patients.** Immunobiology. 2013 Oct 12.

1 F.E.G. and M.R. contributed equally to this work.

2 F.S.-O. and A.A. are shared last authors

Otras publicaciones generadas durante el periodo de tesis

Mendoza-Naranjo A, Bouma G, Pereda C, Ramírez M, Webb KF, Tittarelli A, López MN, Kalergis AM, Thrasher AJ, Becker DL, Salazar-Onfray F. Functional gap junctions accumulate at the immunological synapse and contribute to T cell activation. J Immunol. 2011 Sep 15;187(6):3121-32

Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, González FE, Ramírez M, Reyes D, Pereda C, Hevia D, García T, Salazar L, Ferreira A, Hermoso M, Mendoza-Naranjo A, Ferrada C, Garrido P, López MN, Salazar-Onfray F. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. Clin Cancer Res. 2011 Apr 15;17(8):2474-83

Mendoza-Naranjo A, Saéz P. J, Johansson C. C., Ramírez M., Mandaković D., Pereda C., López M. N., Kiessling R., Sáez J. C., Salazar-Onfray F. (2007). Functional GAP junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. J. Immunol. 178:6949-57

Lopez MN, Pereda C, Ramirez M, Mendoza-Naranjo A, Serrano A, Ferreira A, Poblete R, Kalergis AM, Kiessling R, Salazar-Onfray F. (2007) Melanocortin 1 receptor is expressed by uveal malignant melanoma and can be considered a new target for diagnosis and immunotherapy. Invest Ophthalmol Vis Sci. ;48(3):1219-27

Lopez M, Aguilera R, Perez C, Mendoza-Naranjo A, Pereda C, Ramirez M, Ferrada C, Aguillon JC, Salazar-Onfray F. (2006) The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines. Immunobiology. 211(1-2):127-36

Escobar A, López M, Serrano A, Ramirez M, Pérez C, Aguirre A, González R, Alfaro J, Larrondo M, Fodor M, Ferrada C, Salazar-Onfray F. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. Clin Exp Immunol. 2005 Dec;142(3):555-68