

UCH - FC
Biotecnología
R 145
c 1

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS



**PÉPTIDOS SINTÉTICOS MODIFICADOS DERIVADOS DEL RECEPTOR
MELANOCORTINA-1 (MC1R) INDUCEN LINFOCITOS T CITOTÓXICOS
(CTL) ESPECÍFICOS CONTRA MELANOMA**

Memoria de Título entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título Profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Marcos Ignacio Ramírez Palma

Diciembre, 2006

Santiago - Chile

Director de Tesis: Dr. Flavio Salazar Onfray

Instituto de Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Universidad de Chile



**PÉPTIDOS SINTÉTICOS MODIFICADOS DERIVADOS DEL RECEPTOR
MELANOCORTINA-1 (MC1R) INDUCEN LINFOCITOS T CITOTÓXICOS
(CTL) ESPECÍFICOS CONTRA MELANOMA**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título Profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular

MARCOS IGNACIO RAMÍREZ PALMA

Dr. Flavio Salazar Onfray
Director Seminario de Título

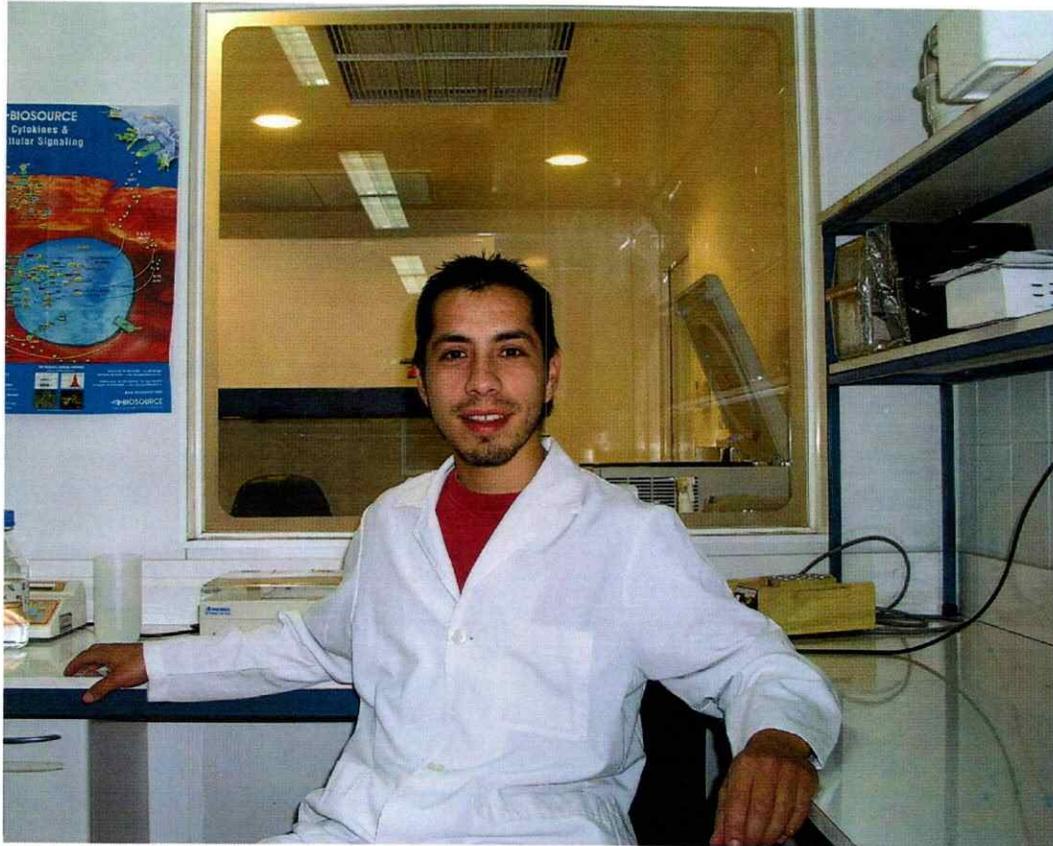
Firma manuscrita de Flavio Salazar Onfray en tinta azul.

Comisión de Evaluación de Memoria de Título
Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

Firma manuscrita de María Rosa Bono Merino en tinta azul.

Dr. Mario Roseblatt Silber
Corrector

Firma manuscrita de Mario Roseblatt Silber en tinta azul.



En verdad no se que escribir de biografía. Pienso que debería ocupar este espacio para escribir lo que yo quiera de la forma que yo quiera redactarlo. Pese a haber tenido una vida muy feliz hasta ahora y que esta tesis me llena de orgullo, creo que es un poco pretencioso escribir una biografía a los 27 años sin haber hecho algo realmente importante. Tengo fé en que algún día si voy a poder escribir una biografía decente, y para eso y para seguir teniendo una vida feliz, es que hago todo lo que hago.

Quiero resaltar el hecho de que por mi paso en la facultad de Ciencias hice grandes amigos y espero que me sigan acompañando por el resto de la vida, ya sea en vivo y en directo o vía messenger si están fuera de Chile.

Tuve después la suerte de llegar en un canasto al laboratorio del Dr. Flavio Salazar, a quien trato de Flavio nomás porque tengo el tremendo orgullo de ser su amigo. Junto con la Meche (Dra. Mercedes López, quien también es mi amiga) me han enseñado mucho más que inmunología.

Quiero por último mencionar a mis padres: Marcos y Margarita, para los cuales está dedicada con todo cariño esta tesis. Ellos son las personas más merecedoras de cualquier reconocimiento que pudiera hacer y de seguro que mis hermanos y mi sobrina Rocío piensan lo mismo, aunque nunca lo hayamos reconocido ni les hayamos retribuido tanto amor como el que ellos nos han dado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Flavio Salazar, a la Dra. Mercedes López, a Mónica Kurte, A Alejandro Escobar, a Claudio Pérez, a Antonio Serrano y a todas las personas del Programa Disciplinario de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en especial a:

Adam Aguirre
Alexandra Ginesta
Alexis Peralta
Álvaro Rojas
Ariadna Mendoza
Arturo Ferreira
Bárbara Pesce
Carlos Cuevas
Carlos Saffie
Cristian Pereda
Diego Catalán
Diego Reyes
Eduardo Villablanca
Felix González
Fermín González
Gabriela Segal

Inelia Butrón
Jaime Venegas
Juan Carlos Aguillón
Juana Orellana
Lorena Aguilar
Lorena Salazar
Marcela Hermoso
Maria Carmen Molina
Marisol Briones
Nancy Fabres
Octavio Aravena
Patricia Langjhar
Raquel Aguilera
Rodrigo González
Roberto Zúñiga
Ruth Mora

También agradezco a la gente del Klinische Kooperationseinheit Dermato-Onkologie del Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), en especial al Dr. Dirk Schadendorf, a la Dra. Annette Paschen, al Dr. Jan Müller-Berghaus y a Hiltrud Schönhaber.

Los fondos provienen de aportes de Fondecyt 1031005 y 1060935, de Fondef DO2I1088 y del Núcleo Milenio de Inmunología e Inmunoterapia, por lo tanto también le agradezco al Gobierno de Chile.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
<i>Sistema inmune y cáncer</i>	2
<i>Linfocitos T citotóxicos</i>	3
<i>Identificación de antígenos tumorales</i>	5
<i>MC1R</i>	6
<i>Péptidos derivados de MC1R son antígenos asociados a melanoma</i>	7
HIPOTESIS	9

OBJETIVO GENERAL	10
<i>Objetivos Específicos</i>	<i>10</i>
MATERIALES Y METODOS.....	12
<i>Tipificación de HLA.....</i>	<i>12</i>
<i>Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMC)</i>	<i>12</i>
<i>Producción de Células Dendríticas</i>	<i>13</i>
<i>Producción de Linfocitos T citotóxicos.....</i>	<i>14</i>
<i>Síntesis de péptidos.....</i>	<i>15</i>
<i>Análisis de afinidad y Citometría de flujo.....</i>	<i>15</i>
<i>Fotografía de células</i>	<i>16</i>
<i>Protocolo ELISpot</i>	<i>16</i>
<i>Selección de linfocitos T CD8⁺</i>	<i>17</i>
RESULTADOS	19
1. <i>Afinidad de los distintos péptidos según la predicción de programas computacionales basados en algoritmos matemáticos.....</i>	<i>19</i>

2. Selección de péptidos sintéticos análogos a la secuencia de MC1R 291, mediante ensayos <i>in vitro</i>	21
3. Generación de células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica.	23
4. Generación de líneas CTL péptido-específicas	25
5. Evaluación de especificidad de la línea anti-MC1R 291-a y anti-MC1R 291-b..	32
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFIA	44

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Péptidos modificados derivados del antígeno asociado a melanoma MC1R...19

Tabla 2. Afinidad relativa de los péptidos modificados derivados de MC1R 291.....20

Tabla 3. Afinidad relativa de los péptidos modificados derivados de MC1R 291.....21

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estabilización de la molécula HLA-A2 en la superficie de células T2 por péptidos nativo y análogos derivados de MC1R.....	23
Figura 2. Propiedades fenotípicas de células dendríticas maduras en el día 7 de cultivo	24
Figura 3. Fotografía de un cultivo de linfocitos y células dendríticas.	26
Figura 4. Respuesta péptido-específica de linfocitos T CD8 ⁺ estimulados con DC cargadas con péptidos nativos derivados de MC1R.....	28
Figura 5. Enriquecimiento de la población de células CD3 ⁺ CD8 ⁺ en distintas etapas del proceso de generación de líneas CTL	29
Figura 6. Especificidad de las líneas CD8 ⁺ después de completar el protocolo de estimulaciones con péptidos y enriquecimiento de los linfocitos T CD8 ⁺	30
Figura 7. Linfocitos T específicos para péptidos modificados derivados de MC1R 291 pueden reconocer péptidos nativos	33
Figura 8. Línea enriquecida de linfocitos T específicos para péptidos modificados derivados de MC1R 291 pueden reconocer péptidos nativos con mayor frecuencia.....	34
Figura 9. Duración del complejo péptido-HLA-A2.1 para los péptidos 291 y 291-b en la superficie de células T2.....	35

Figura 10. Linfocitos CD8+ inducidos con el péptido modificado MC1R 291-b son capaces de reconocer células de melanoma37

LISTA DE ABREVIATURAS

MC1R:	Receptor de Melanocortina 1
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
PBL:	Linfocitos de sangre periférica
AAT:	Antígeno asociado a tumor
AAM:	Antígenos asociados a melanoma
DC:	Célula dendrítica
α -MSH:	Hormona estimulante de melanocitos alfa
CPA:	Célula presentadora de antígenos
CTL:	Linfocito T citotóxico
SFB:	Suero fetal bovino
TIL:	Linfocito infiltrante de tumor
DMSO:	Dimetilsulfóxido
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
HLA:	Antígenos leucocitarios humanos (Human Leukocyte Antigen)
AcMo:	Anticuerpo Monoclonal

RESUMEN

La inducción *in vivo* o *ex vivo* de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) específicos contra péptidos derivados de antígenos asociados a tumor es una de las estrategias comúnmente empleadas en inmunoterapia contra el cáncer. El receptor de melanocortina 1 (MC1R), presente en melanocitos y sobreexpresado en células de melanoma, ha sido descrito por nosotros como un antígeno tumoral. MC1R es el ligando natural de la hormona estimuladora de melanocitos alpha (α -MSH), que está relacionada a la pigmentación cutánea. En trabajos anteriores hemos demostrado que tres péptidos sintéticos nonaméricos MC1R 244 (TILLGIFFL), MC1R 283 (FLALIICNA), y MC1R 291 (AIIDPLIYA) pueden generar CTL péptido-específicos capaces de reconocer células de melanoma que expresan MC1R.

Utilizando algoritmos computacionales, se sintetizaron péptidos derivados de la secuencia de MC1R que va desde el aminoácido 291 hasta el 300 (MC1R 291), modificados en ciertas posiciones aminoacídicas para favorecer el grado de unión a la molécula MHC clase I del isotipo HLA-A2.1. Luego se evaluó la afinidad de los péptidos, seleccionándose los que presentaban una mayor afinidad en comparación con el péptido original (MC1R 291) y se estudió su capacidad para inducir líneas de CTL péptido-específicas. Con este fin se generaron *in vitro*, CTL específicos contra estos péptidos a partir de linfocitos obtenidos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes normales HLA-A2.1 positivos. Células dendríticas (DCs) fueron cargadas exógenamente con los distintos péptidos y se co-cultivaron con los linfocitos autólogos. Las líneas celulares generadas fueron analizadas en cuanto a su capacidad de

reconocer el péptido original MC1R 291 presentado por células T2 HLA-A2.1⁺ y células tumorales HLA-A2.1⁺ que expresan MC1R. Nuestros resultados indican que es posible generar líneas de linfocitos T citotóxicos con el péptido MC1R 291-b, los que reconocen también el péptido original cuando es presentado en el contexto de MHC clase I. Este estudio demuestra la factibilidad de generar respuestas inmunes contra antígenos derivados de MC1R mejorados artificialmente, lo que podría aplicarse también a otros antígenos y así contribuir al diseño de nuevas estrategias de inmunoterapia contra el cáncer.

ABSTRACT

The *in vivo* or *ex vivo* induction of cytotoxic T CD8+ lymphocytes (CTL) specific against peptides derived from tumor associated antigens is one of the strategies commonly used in cancer immunotherapy. The melanocortin 1 receptor (MC1R), present in melanocytes and overexpressed in melanoma cells, has been described by us as a tumor associated antigen. MC1R's natural ligand is the alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH), which is related to cutaneous pigmentation. In previous works we have demonstrated that three synthetic nonameric peptides MC1R 244 (TILLGIFFL), MC1R 283 (FLALIICNA), and MC1R 291 (AIIDPLIYA) can generate peptide-specific CTL able to recognize melanoma cells that express MC1R.

Using computer algorithms, peptides derived from the MC1R original sequence that goes from amino acid 291 to the 300 (MC1R 291), were synthesized. These peptides were modified at certain aminoacidic positions to favor the degree of binding to the isotype HLA-A2.1 of MHC class I molecule. Later we evaluated the affinity of these peptides, selecting those that displayed higher affinity than the original peptide (MC1R 291). Then we evaluated the capacity of the peptides to generate peptide-specific CTL lines. With this aim, we generated *in vitro* specific CTL against these peptides from lymphocytes of peripheral blood mononuclear cells of (PBMC) from normal HLA-A2.1 donors. Dendritic cells (DCs) were loaded exogenously with different peptides and co-cultivated with autologous lymphocytes. Cell lines generated were analyzed for their capacity to recognize the original peptide MC1R 291 associated to HLA-A2.1⁺ molecules on T2 cells and also HLA-A2.1⁺ melanoma cell lines that naturally express

MC1R. Our results indicate that it is possible to generate CTL using the modified peptide (291-b), and that these CTL recognize the original peptide when it is presented in the MHC class I context. This study demonstrates the feasibility of generating immune responses against antigens derived from artificially improved MC1R peptides, which could be applied also to other antigens and thus contribute to the design of new immunotherapies against cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la división y crecimiento descontrolado de algunas células, las que pueden adquirir la capacidad de invadir el tejido donde se originaron, viajar por la linfa y la sangre produciendo metástasis en órganos distantes. Los avances científicos y tecnológicos de los últimos años han proporcionado nuevos conocimientos sobre la aparición, desarrollo y crecimiento de células malignas, lo que se traduce en mejores tratamientos de la enfermedad. Sin embargo, el cáncer sigue siendo hoy en día la principal causa de muerte en los países desarrollados. En Chile, los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte de la población mayor de 15 años (Medina y col., 2001) precedida sólo por las enfermedades cardiovasculares. La tasa de incidencia promedio se estima en 220 a 250 por 100.000 habitantes, lo que se traduce en 36.100 a 36.500 casos nuevos por año. Según estadísticas del Ministerio de Salud, la tasa de mortalidad por cáncer en el año 2004 fue de 1071,4 por 100.000 adultos, con un total de 19.900 muertes en ambos sexos. Entre los cánceres cutáneos, el melanoma es la principal causa de muerte. En Europa, Estados Unidos y especialmente en Australia, su incidencia ha aumentado progresivamente en las últimas décadas. En Chile, en el año 2004 se constataron 152 muertes por melanoma maligno, y su incidencia aumentó de 1,1 en 1992 a 1,9 casos por 100.000 habitantes en el 2004 (Programa Nacional de Cáncer, 2006).

El melanoma es un tumor derivado de la transformación maligna de los melanocitos y otras células pigmentadas. La mayoría de los melanomas se localizan en la piel y menos frecuentemente en mucosas, pero dado que los melanocitos derivan de la

cresta neural, pueden observarse en otras localizaciones como retina y meninges (Lawson y col., 2004). El melanoma suele afectar a adultos, pero ocasionalmente también afecta a niños y adolescentes. En raras ocasiones también puede aparecer en partes del cuerpo que no están recubiertas de piel, como los ojos, la boca, la vagina, el intestino grueso y otros órganos internos. Entre los factores de riesgo para desarrollar un melanoma están piel clara, historia familiar de melanoma, desórdenes inmunoinhibitorios e historias de exposición solar prolongada sin la adecuada protección (Gallagher y col., 1986; Redondo, 2000; Green y Battistutta 1990).

Sistema inmune y cáncer

La utilización del sistema inmune como tratamiento para el cáncer se denomina inmunoterapia. Esta aproximación terapéutica se basa en el control del crecimiento tumoral mediante la activación del sistema inmunológico. La estrecha relación entre inmunidad y cáncer se conoce desde hace más de un siglo, cuando el científico William Coley obtuvo respuestas anti-tumorales esporádicas, inyectando en pacientes extractos de bacterias (Coley y col., 1991). Este hecho demostró que la activación inespecífica del sistema inmune promovía una resistencia contra ciertos tumores. A estas primeras experiencias le siguieron, durante las décadas del cuarenta y cincuenta, una gran cantidad de estudios en ratones que demostraban que es posible inducir inmunidad anti-tumoral en estos modelos animales, abriendo así perspectivas interesantes para el diseño de vacunas contra diversos cánceres humanos (Jaffee y col., 1996; Klein y col., 1960).

Linfocitos T citotóxicos

En la década de los 90, experimentos pioneros demostraron que los linfocitos T, son capaces de reconocer específicamente y destruir no solamente a células infectadas por virus u otros microorganismos, sino también eliminar células cancerosas (Boon y col., 1994; Van den Eynde y col., 1995; Coulie y col., 1994). Los linfocitos T poseen receptores altamente específicos que les permiten detectar células que expongan en sus membranas moléculas extrañas o patológicas, conocidas como antígenos, como sucede con las células infectadas o las cancerosas (Kawakami, y col. (a), (b), (c), 1994; Kawakami, y col., 1995). Cuando un linfocito con un receptor específico encuentra a su antígeno en la superficie de la célula tumoral, prolifera en respuesta a este reconocimiento y secreta citoquinas como interleuquina-2 (IL-2), interferón-gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) (Barth y col., 1991). Estas células T anti-tumorales han sido expandidas *in vitro* y utilizadas *in vivo* con el fin de tratar grandes masas tumorales, tanto en ratones como en humanos (Rosenberg y col., 1986). Estas observaciones han permitido la identificación de antígenos tumorales reconocidos por células T autólogas humanas, usando técnicas de clonación molecular (Boon y col., 1995)

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) reconocen tumores a través de fragmentos peptídicos de 8-10 aminoácidos derivados de proteínas citoplasmáticas o nucleares asociados a MHC clase I, expresados en la superficie de las células tumorales (Vanky, 1986; Burnet, 1970). Los CTL melanoma-específicos, transferidos

adoptivamente o activados *in vivo* por epítomos de antígenos asociados a melanoma, poseen capacidad terapéutica, pudiendo inducir la regresión de tumores y sus micro metástasis (Meidenbauer y col., 2003).

Durante los últimos doce años, varios antígenos asociados a melanoma (AAM), reconocidos por CTL, han sido identificados y sus epítomos peptídicos caracterizados, utilizando métodos genéticos y bioquímicos (Boon y col., 1994, 1995; Slingluff y col., 1993). La clonación de genes que codifican AAM humanos ha permitido su caracterización y su clasificación en diferentes categorías: a) Antígenos derivados de proteínas cuyos genes están relacionados con las etapas primarias del desarrollo embrionario (MAGE, BAGE, RAGE y NY-ESO) (Gaugler y col., 1994; Tanzarella y col., 1999); b) Epítomos derivados de genes mutados en células tumorales o genes transcritos en diferentes niveles en tumores comparados con células normales (*ras* mutado, rearrreglo *bcr/abl*, *Her2/neu*, p53, citocromo P450 1B1, entre otros); c) Epítomos derivados de oncovirus (proteínas E6 y E7 de virus de papiloma humano); d) Antígenos de diferenciación, que se expresan en células normales o neoplásicas derivadas del mismo tejido (MART-/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, tirosinasa y proteína relacionada a tirosinasa, entre otros) (Coulie y col., 1994; Kawakami y col., (a), (b), 1994; Kawakami y col., 1995; Brichard y col., 1993). Hace algunos años en nuestro grupo se identificaron y caracterizaron nuevos antígenos derivados del receptor de Melanocortina 1 (MC1R) (Salazar-Onfray y col., 1997) y se ha estudiado su presencia y distribución en los tejidos normales y tumorales (Salazar-Onfray y col., 2002). Los genes que codifican estos antígenos no solamente se expresan en los melanomas, sino también en melanocitos normales y en el epitelio pigmentario de la retina, por lo que pueden ser

considerados como auto-antígenos (Novellino y col., 2005). Los CTL específicos contra este tipo de antígenos pueden ser aislados de los ganglios linfáticos, de los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) o de PBL de pacientes con melanoma (Salazar-Onfray y col., 1997).

Identificación de antígenos tumorales

La importancia clínica de la identificación de AAT radica en la posibilidad de confeccionar terapias dirigidas específicamente contra células tumorales que los expresen.

Entre las estrategias utilizadas para la identificación de AAT, se encuentran los estudios de reconocimiento de antígenos peptídicos por linfocitos T. Estos péptidos son obtenidos de librerías de expresión de DNA derivadas de tumor (Andersen y col., 2003; Mathiassen y col., 2001), o por elución de complejos MHC-péptidos en células tumorales (Hunt y col., 1992). Debido a que estos protocolos de caracterización de antígenos resultan muy laboriosos, se han diseñado nuevas metodologías que buscan facilitar la búsqueda de estas secuencias. Una de ellas se conoce, como *inmunología reversa* (Maecker y col., 2001, 2005). Esta consiste básicamente en identificar en forma teórica un antígeno dado, basándose en predicciones de unión a una molécula de MHC en particular, con una afinidad alta o intermedia, a través de motivos establecidos dentro de la estructura, utilizando herramientas de proteómica y genómica (Tong y col., 2006). Posteriormente células presentadoras son cargadas con estos antígenos teóricos (ya sintetizados), y cocultivadas *in vitro* con LT autólogos para su expansión. Si la población de LT resultantes reconoce células tumorales que expresan epítomos

relevantes, o si reconoce la proteína completa pulsada en un *pool* de células presentadoras, el candidato es considerado un AAT.

MC1R

MC1R es uno de los cinco receptores de melanocortina que han sido identificados y clonados. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores clase A acoplados a proteína G y todos ellos están funcionalmente acoplados a la adenilato ciclasa y median sus efectos activando la vía de señales dependiente de AMP cíclico (AMPC) (Chhajlani y col., 1992). Estos receptores son los ligandos naturales de la hormona adrenocorticotrópica y las hormonas melanocitos estimulantes (α , β y γ -MSH) producidas principalmente en la glándula pituitaria, y que tiene un rol importante en la pigmentación cutánea y la función renal.

MC1R es una proteína de 35 kDa (Tatro y col., 1990) que está constituida por 317 aminoácidos con siete segmentos transmembrana. La unión de la α -MSH con MC1R en los melanocitos inicia una cascada de señales que activa la adenilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares de AMPC e induciendo la actividad de la tirosinasa, enzima limitante en la vía sintética de la eumelanina (Hunt y col., 1994; Abdel-Malek y col., 2000) permitiendo que los melanocitos, presentes en abundancia entre la dermis y epidermis, formen el pigmento melanina y lo dispersen por la piel (Suzuki y col., 1996).

Inicialmente, se describió la presencia de MC1R en melanocitos y melanomas (Tatro y col., 1990; Suzuki y col., 1996; Xia y col., 1996), aunque este receptor es

expresado también, pero en baja proporción en monocitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos (Star y col., 1995; Bhardwaj y col., 1997; Taherzadeh y col., 1999; Catania y col., 1996; Bohm y col., 1999). Además, Salazar y col. demostraron que este receptor se expresa también en líneas celulares y tejidos frescos de melanoma cutáneo, con una menor expresión en varios tejidos normales como queratinocitos, células dendríticas cultivadas *in vitro*, monocitos activados y en células de la glándula adrenal, cerebelo e hígado (Salazar-Onfray y col., 2002). La función de MC1R en estos tipos celulares, aparte de la melanogénesis no está clara, aunque algunos investigadores postulan que MC1R mediaría algunos de los efectos de la α -MSH en reacciones inmunes e inflamatorias (Scholzen y col., 1998; Bhardwaj y col., 1994).

Péptidos derivados de MC1R son antígenos asociados a melanoma

Utilizando la metodología de inmunología reversa, se logró la identificación de tres péptidos restringidos a HLA-A2.1, derivados de MC1R, con capacidad para generar una respuesta anti-peptídica mediada por CTL derivados de PBL de donantes normales (Salazar-Onfray y col., 1997). Estos péptidos, al ser presentados por células dendríticas fueron capaces de estimular linfocitos CD8⁺ *in vitro*. Los linfocitos T CD8⁺ además de reconocer células blanco (HLA-A2.1⁺) cargadas exógenamente con el respectivo péptido, también fueron capaces de reconocer células transfectadas con el gen de MC1R y lo que es más importante, reconocer melanomas HLA-A2.1 que expresan MC1R. Estos resultados indican que péptidos derivados del MC1R son procesados y presentados naturalmente por células de melanoma, por lo que los epítomos derivados de este receptor constituyen verdaderos antígenos melanoma-específicos (Salazar-Onfray y col.,

1997). Debido a la relativamente baja afinidad de estos péptidos por la molécula HLA-A2.1 nos planteamos realizar modificaciones en los péptidos antigénicos con el fin de aumentar su afinidad por el MHC sin variar su antigenicidad. Estos péptidos deben ser probados *in vitro* para determinar su capacidad de inducir líneas primarias de CTL específicos contra melanoma, lo que tiene relevancia con el diseño de nuevas y mejores estrategias inmunoterapéuticas.

HIPOTESIS

Previamente ha sido demostrado que es posible generar líneas de linfocitos T citotóxicos que reconozcan células tumorales que expresan MC1R, mediante la utilización de péptidos sintéticos correspondientes a secuencias aminoacídicas derivadas de MC1R.

Nosotros postulamos que sería posible obtener líneas CTL utilizando péptidos modificados, análogos a los derivados de MC1R, con una mayor avidéz para la molécula HLA-A2.1, sin variar su especificidad.

OBJETIVO GENERAL

Producir líneas CTL contra péptidos modificados derivados de MC1R con mayor avidéz para HLA-A2.1 pero con similar especificidad, con el fin de mejorar potenciales vacunas contra melanoma.

Objetivos Específicos

- 1.- Análisis de las secuencias peptídicas originales y sintéticas derivadas de MC1R mediante programas computacionales predictivos disponibles en la red que den cuenta de la afinidad de estos péptidos por la molécula HLA-A2.1.
- 2- Selección de péptidos sintéticos análogos a la secuencia de MC1R 291 con mayor afinidad empírica para HLA-A2.1, mediante la medición por citometría de flujo de los niveles de expresión de HLA-A2.1 presente en la membrana de células T2.
- 3.- Utilización de células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica de donantes normales, para la generación de líneas de linfocitos T CD8⁺ péptido-específicos.
- 4.- Evaluación del enriquecimiento de la población de linfocitos T CD8⁺ producidos mediante citometría de flujo.
- 5.- Evaluación de la especificidad a través de ensayos de ELISpot de líneas de linfocitos

T CD8⁺ péptido-específicos obtenidas mediante estimulaciones con DCs. Esto con el objetivo de obtener líneas específicas para:

a) Péptidos modificados seleccionados de MC1R

b) Péptidos nativos de MC1R

c) Líneas de melanoma HLA-A2.1⁺/MC1R⁺

MATERIALES Y METODOS

Tipificación de HLA

A 500 µl de sangre periférica se le agregaron 900 µl de agua destilada y se agitó vigorosamente en un vortex. Pasados 10 segundos, se agregó 100 µl de PBS 10X y se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm. Se repitió el procedimiento 3 veces hasta obtener un pellet blanco, el cual se lavó finalmente con Buffer de tinción (0,1% Acida de Sodio y 10% Suero Fetal Bovino (SBF) en PBS 1X) (Beckton–Dickinson, USA). Se incubó con el anticuerpo monoclonal HB82 (donado gentilmente por el DR. Rolf Kiessling, Instituto Karolinska) específico para el isotipo HLA-A2.1 del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, por 1 hora a 4°C. Se lavó 3 veces con buffer de tinción y se incubó por 30 minutos a 4°C con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Immunotools, Germany). Finalmente se lavó 2 veces con buffer de tinción y se fijó el pellet agregando 200 µl de Paraformaldehido 2X (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). La expresión de HLA-A2.1 de las distintas muestras se analizó mediante Citometría de Flujo (FACS Sorter, Beckton–Dickinson, USA).

Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMC)

Concentrados leucocitarios de donantes normales (Buffy Coats) positivos para HLA-A2.1 obtenidos del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, fueron diluidos a una razón de 1:2 en PBS estéril.

Cada muestra fue separada por gradiente de densidad en tubos cónicos Falcon de

50 ml (Beckton–Dickinson, USA) que contenían 10 ml de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Sweden) y fue centrifugada durante 20 minutos a 1400 rpm, sin freno a una temperatura de 18°C, utilizando una centrifuga refrigerada (Eppendorf modelo 5810R, Hamburg, Germany). Se transfirió la banda de células mononucleares a tubos cónicos Falcon de 50 ml, se llevó a un volumen de 50 ml con PBS estéril y se centrifugó durante 5 minutos a 1800 rpm, resuspendiéndose el pellet en 40 ml de PBS 1X, el cual se lavó 2 veces centrifugando a 1200 rpm por 5 min. El pellet se resuspendió en medio AIM-V (Gibco, Invitrogen Corp., NY) y se cuantificó y determinó la viabilidad de las células (PBMC) por exclusión con Azul Tripano.

Producción de Células Dendríticas

Se incubaron 5×10^7 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por 2 horas a 37°C en una botella Nunc EasyFlask de 75 cm² de poliestireno (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) en un volumen total de 10 ml de medio AIM-V. La fracción no adherente fue congelada y las células que permanecieron adheridas fueron cultivadas en 10 ml de medio CellGro (CellGro DC Medium, Cellgenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg, Germany) suplementado con 800 U/ml de GM-CSF y 1000 U/ml de IL-4 (US Biological, USA). A las 48 horas de cultivo, se adicionaron 5 ml de medio CellGro suplementado con 2400 U/ml de GM-CSF y 3000 U/ml de IL-4. A las 96 horas de cultivo, se extrajeron 5 ml de sobrenadante y se adicionaron 5 ml de medio CellGro suplementado con 2400 U/ml de GM-CSF y 3000 U/ml de IL-4. Pasados 2 días se agregó el estímulo de maduración, que consistió en 2 ml de medio CellGro suplementado con 4,25 ng/ml de TNF- α (US Biological, USA), 4,25 ng/ml de IL-6, 17

ng/ml de IL-1 β (US Biological, USA) y 8,5 μ g/ml de PGE₂. Pasadas 48 horas de cultivo con el estímulo de maduración, las células no adherentes fueron lavadas una vez en PBS 1X y resuspendidas en medio CellGro a una concentración de 3x10⁵ células/ml.

De esta suspensión, se cultivaron alícuotas de 500 μ l por pocillo en una placa Falcon de 6 pocillos (BD, NJ, USA), durante 4 horas a 37°C con 10 μ g/ml de los distintos péptidos, dejando la placa levemente inclinada.

Producción de Linfocitos T citotóxicos

Se descongeló la fracción de células no adherentes congeladas el primer día y luego de lavar 2 veces en PBS estéril, se resuspendieron a una concentración de 1,5x10⁶ células/ml en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, HyClone, USA) suplementado con 10% SFB, 5 ng/ml de IL-6 (US Biological, USA) y 0,4 ng/ml de IL-12. A cada pocillo de la placa de dendríticas, se le agregaron 2 ml de la suspensión y se alimentó con el mismo medio suplementado cada 48 horas.

Transcurridos 10 días de la primera estimulación con células dendríticas pulsadas con péptidos, se estimuló nuevamente con células dendríticas a una razón de 30 linfocitos por cada DC, en medio IMDM suplementado con 10% SFB, 20 U/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-7 (USBiological, USA). Se alimentó con el mismo medio suplementando cada 48 horas.

Las siguientes estimulaciones se realizaron con monocitos pulsados con péptidos a partir del PBMC congelado cada 10 días. Para esto se cultivaron 3x10⁷ células de PBMC por pocillo en 2 ml de medio AIM-V durante 2 horas a 37°C en una placa Falcon

de 6 pocillos. Luego las células no adherentes fueron removidas y las células que permanecieron adheridas al fondo de la placa fueron lavadas 3 veces en PBS estéril.

Posteriormente se cultivaron las células adherentes en 1 ml de medio IMDM 10% SFB, con 20 ug/ml de los distintos péptidos durante 5 horas y se adicionaron 3 ml de medio IMDM 10% SFB, conteniendo 5×10^6 linfocitos, suplementado con 27 U/ml IL-2 y 13 ng/ml de IL-7.

Al día 36 las células respondedoras fueron cosechadas para su posterior análisis de especificidad mediante ELISpot.

Síntesis de péptidos

Los péptidos derivados de MC1R fueron sintetizados por un método de fase sólida, usando múltiples sintetizadores de péptidos y purificados por HPLC, como se describe en el trabajo de Celis y col., 1994.

Análisis de afinidad y Citometría de flujo

La línea celular T2, producto del híbrido de una leucemia de células T y B (Salter y Cresswell, 1986) fue gentilmente donada por el Dr. Jan Müller-Berghaus del Clinical Cooperation Unit for Dermato-Oncology del DKFZ, Alemania. Células T2 (5×10^5 /pocillo) fueron cultivadas en una placa de 48 pocillos en 500 μ l de medio RPMI durante 4 horas, en presencia de 10 μ g/ml de los distintos péptidos.

Al término del cultivo las células se lavaron con buffer de tinción (PBS 10% SFB, 0,1% azida de sodio), y se incubaron 30 minutos en presencia de 2 μ g/ml del

anticuerpo monoclonal anti-HLA-A2.1 (HB82). Luego de lavar 3 veces con el mismo buffer, se cultivaron por otros 30 minutos en presencia de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC (PHARMINGEN, San Diego, CA, USA.). Pasado este tiempo, las células se lavaron 2 veces y finalmente se fijaron en paraformaldehído 2% y se procedió a medir la expresión de HLA-A2.1 en un citómetro de flujo FACScan (BECTON DICKINSON, San Diego, CA, USA.).

Fotografía de células

Se retiró el sobrenadante de cultivo de placas de 6 pocillos y se dejó secar a temperatura ambiente. Se adicionaron unas gotas de metanol 70% a -20°C por 10 minutos y posteriormente unas gotas de reactivo de Giemsa. Luego de 5 minutos se retiró el exceso de reactivo de Giemsa y se lavó con agua destilada. La imagen fue obtenida mediante la utilización de un microscopio Leica (Leica Microsystems Wetzlar GMBH, Germany) de contraste de fase y cámara Olympus (Camedia C-5050 5.0 megapixel, Japan).

Protocolo ELISpot

Se sensibilizaron placas de ELISpot (Millipore, MAIP N45) con 75 μl /pocillo de anticuerpo anti IFN- γ (Mabtech, Sweden) a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en buffer Carbonato/Bicarbonato 0.1M pH 9.6 y se incubó toda la noche a 4°C . Posteriormente, la placa fue lavada 3 veces con PBS, y luego bloqueada con PBS BSA 1% y se incubó por 2 horas a 37°C . Luego de lavar una vez con 200 μl de medio RPMI, se colocaron 100 μl por pocillo de una suspensión de linfocitos ($10^6/\text{ml}$), para luego adicionar 80 μl una

suspensión de células T2 ($12,5 \times 10^5$ /ml) y 20 μ l de péptido relevante, o péptido irrelevante a 10 μ g/ml. Fueron usados también como control T2 sin péptido (se adicionaron 20 μ l de RPMI solo). Se incubaron las células por 12 horas a 37°C, y se detuvo la reacción lavando 6 veces con PBS Tween 0,05%. Posteriormente se agregaron 100 μ l por pocillo del segundo anticuerpo (anti IFN- γ) (Mabtech, Sweden) diluido a 0,75 μ g/ml en buffer PBS BSA 1%, y se incubó por 2 horas a 37°C. Luego de lavar 6 veces con PBS Tween 0,05%, se adicionaron 100 μ l por pocillo de Estreptoavidina / ALP (Mabtech, Sweden) diluida 1:1000 en PBS BSA 1%. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavó 6 veces con PBS Tween 0,05%, y finalmente una vez con 100 μ l por pocillo de buffer sustrato (0.1M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 50mM MgCl₂, pH 9.5). Finalmente, 100 μ l de sustrato BCIP/NBT fueron adicionados por pocillo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción fue detenida removiendo la solución sustrato con abundante agua. Los datos obtenidos fueron presentados como Colonias Formadoras de Spots (SFC)/ 100.000 células.

Selección de linfocitos T CD8⁺

Se enriqueció la población de linfocitos TCD8⁺ por selección positiva, usando MACS beads anti-CD8 (Miltenyi Biotec) en columnas miniMACS (Miltenyi Biotec). Se centrifugaron 5×10^6 linfocitos estimulados a 1200 rpm por 10 minutos y se resuspendieron en 80 μ l de buffer de separación (0,5% BSA y 2 mM EDTA en PBS estéril). Se adicionaron 20 μ l de MicroBeads y se incubaron por 15 minutos a 4°C. Se añadieron 10 ml de buffer de separación y se centrifugaron por 10 minutos a 1200 rpm. Se resuspendieron las células en 500 μ l de buffer de separación y se procedió a hacer la

separación magnética. Se colocó la columna en el magneto unido al soporte metálico y se eluyeron las células resuspendidas en el buffer de separación a través de la columna. Se lavó la columna con buffer de separación, dejando fluir 3 veces 500 μ l del buffer. Luego se removió la columna del magneto y se colocó sobre un tubo Falcon de 15 ml (Becton-Dickinson, USA). Se agregó 1 ml de buffer y se dejaron fluir todas las células depositadas en la columna mediante la utilización del émbolo suministrado con la misma.

Se centrifugaron las células a 1200 rpm por 10 minutos, y se resuspendieron en medio IMDM suplementado con 20 U/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-7.

RESULTADOS

1. Afinidad de los distintos péptidos según la predicción de programas computacionales basados en algoritmos matemáticos.

Se diseñaron y luego se sintetizaron péptidos análogos al péptido MC1R 291, modificados en ciertas posiciones aminoacídicas que favorecerían el grado de unión a HLA-A2.1 (Tabla 1), con el fin de lograr una mejor estimulación de linfocitos T citotóxicos. Esta mejor afinidad fue evaluada mediante el uso de algoritmos computacionales disponibles en Internet y mediante ensayos *in vitro*.

Péptido	Secuencia aminoacídica
291 original	AIIDPLIYA
291-a	FLIDPLIYV
291-b	ALIDPLIYA
291-c	AIIDPLIYV
291-d	FIIDPLIYA

Tabla 1. Péptidos sintéticos modificados, derivados del antígeno asociado a melanoma MC1R 291. Se cambiaron principalmente los aminoácidos 1, 2 y 9, los cuales favorecerían la afinidad de dichos péptidos por la molécula HLA-A2.1.

Según el análisis hecho por el programa computacional "SMM" disponible en la página de internet <http://zlab.bu.edu/SMM>, la afinidad de un péptido por la molécula HLA-A2.1 está expresada como la concentración de péptido (nM) necesaria para desplazar el 50% de un ligando arbitrario de la molécula HLA-A2.1 (IC50). El péptido de referencia utilizado en este algoritmo es el siguiente: ALAKAAAV (Kd = 170 nM).

Los resultados de afinidad para los distintos péptidos estudiados derivados del péptido 291 de MC1R fueron los señalados en la siguiente tabla:

Péptido	Secuencia	IC50 (nM)
291 original	AIIDPLIYA	5.59
291-a	FLIDPLIYV	1.57
291-b	ALIDPLIYA	4.13
291-c	AIIDPLIYV	5.62
291-d	FIIDPLIYA	5.00

Tabla 2. Afinidad relativa de péptidos modificados derivados de MC1R 291 según el análisis computacional predictivo disponible en <http://zlab.bu.edu/SMM>

De estos datos se deduce que los péptidos 291-a, 291-b y 291-d tendrían una mejor afinidad que el péptido 291 por la molécula HLA-A2.1.

Según el análisis que hace otro algoritmo computacional basado en el programa Rankpep (<http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>), los péptidos que se unen a una molécula MHC determinada comparten similitud en su secuencia, por lo que patrones de secuencia han sido tradicionalmente usados para predecir la unión de péptidos al MHC. A los péptidos se les asigna un puntaje según la comparación que se establece con una matriz.

Para la molécula HLA-A2.1 se ha establecido una secuencia consenso (SLSSMVASV), a la cual se le ha asignado un porcentaje máximo de unión de 114 puntos. Todos los péptidos ingresados por el usuario son comparados con esta secuencia

y se les asigna un puntaje. Estos puntajes son luego expresados como porcentajes del máximo de afinidad. Los resultados arrojados por el programa se encuentran graficados en la siguiente tabla:

Péptido	Secuencia	puntaje	Porcentaje del máximo
291 original	AIIDPLIYA	47	41.23%
291-a	FLIDPLIYV	70	61.4%
291-b	ALIDPLIYA	57	50%
291-c	AIIDPLIYV	67	58.77%
291-d	FIIDPLIYA	40	35.09%

Tabla 3. Afinidad relativa de los péptidos modificados derivados de MC1R 291 según el análisis computacional Rankpep, disponible en el sitio de Internet <http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>.

Según este análisis informático, los péptidos 291-a, 291-b y 291-c tendrían una mejor afinidad por la molécula HLA-A2.1 que el péptido original de MC1R (291), mientras que el péptido 291-d sería el menos afín.

2. Selección de péptidos sintéticos análogos a la secuencia de MC1R 291, mediante ensayos *in vitro*

Para hacer una prueba de la afinidad real por la molécula HLA-A2.1 de péptidos sintéticos modificados, y compararlos con el péptido nativo, se utilizó la línea celular T2 que proviene de un linfoma de células T positivas para HLA-A2.1. Esta línea tiene una mutación que inactiva los genes TAP-1 y TAP-2. La función normal de estas proteínas

es transportar péptidos desde el citoplasma hasta el lumen del retículo endoplasmático. Por lo tanto, éstas células presentan una deficiencia de péptidos endógenos unidos a la molécula MHC clase I en la membrana celular. La asociación de péptidos con la cadena pesada de la molécula MHC clase I es necesaria para la unión de la β_2 microglobulina y su posterior translocación a la superficie celular. Al carecer de los transportadores TAP 1 y 2, las células T2 expresan bajos niveles de MHC clase I (Salter y Cresswell, 1986) y se degradan rápidamente debido a la ausencia de péptido que los estabilice. Pero si se cultivan estas células en presencia de un péptido afín por la molécula MHC clase I, HLA-A2.1, ésta se estabiliza y el complejo péptido-MHC (p-MHC) no se degrada tan rápidamente (Zehn y col., 2004)

Los niveles de expresión del complejo p-MHC serán un reflejo de la afinidad de dicho péptido por la molécula MHC clase I (Zehn y col., 2004), por lo que mediante la utilización de anticuerpos específicos para la molécula HLA-A2.1 se puede establecer una comparación entre las afinidades relativas de distintos péptidos.

La figura 1, muestra un ensayo de citometría de flujo que representa la expresión de MHC I estabilizada por la unión del péptido. Los péptidos 291-a y 291-b fueron seleccionados por presentar una mayor afinidad de unión relativa a la molécula HLA A-2.1. Esta afinidad fue incluso mayor que la presentada por el péptido nativo.

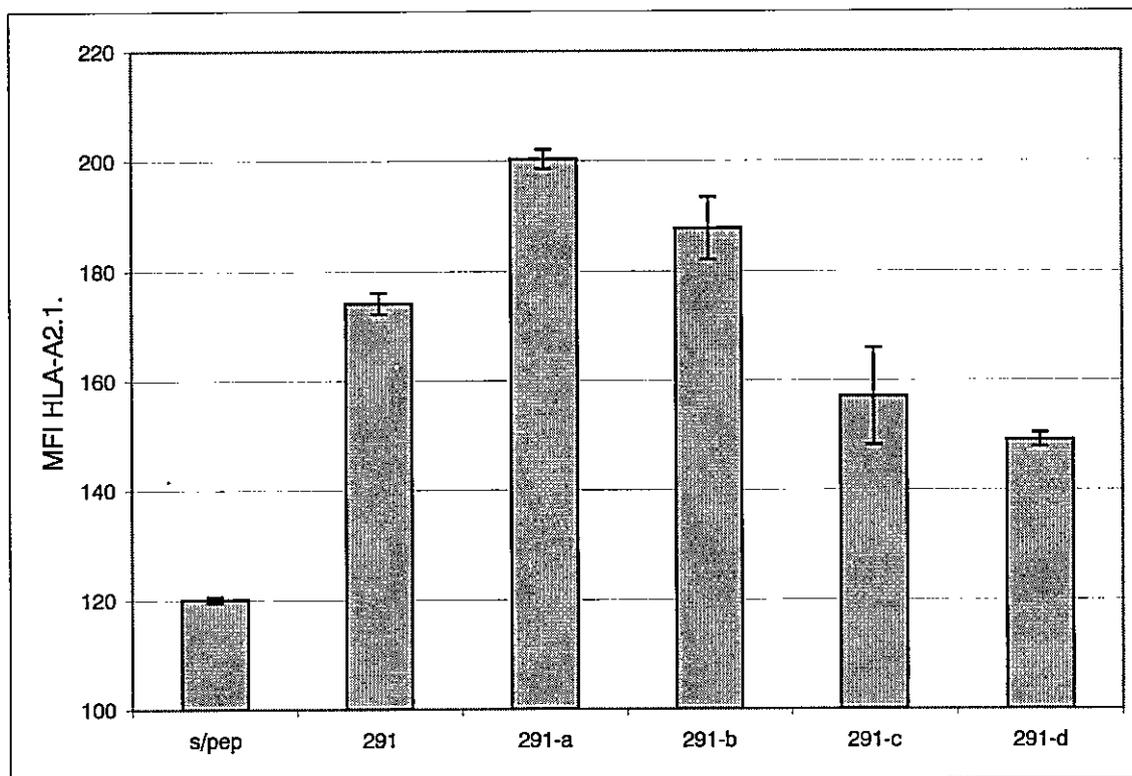


Figura 1. Estabilización de la molécula HLA-A2 en la superficie de células T2 por péptidos nativo y análogos derivados de MC1R. Los péptidos de MC1R 291 y los péptidos modificados 291-a, 291-b, 291-c y 291-d, fueron analizados en cuanto a su afinidad por la molécula MHC I (HLA-A2.1) mediante citometría de flujo.

3. Generación de células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica.

Mediante el protocolo descrito en materiales y métodos, se generaron *in vitro* células dendríticas a partir monocitos de sangre periférica. Utilizando citometría de flujo con anticuerpos específicos para distintos marcadores de membrana, se pudo comprobar que las células obtenidas presentaban un fenotipo característico de células dendríticas maduras (Figura 2), ya que expresan CD11c (marcador de células dendríticas), así como también moléculas MHC clase I y MHC clase II que permiten la presentación de

péptidos antigénicos a los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ respectivamente. También se observó la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 y CD40, y las moléculas asociadas a maduración de DCs CD36 y CD83; así como del receptor de quimioquinas CCR7, el cual permite migrar a la célula dendrítica hacia los ganglios linfáticos y así presentar los antígenos a los linfocitos T vírgenes. Finalmente, como se esperaba, la expresión de los marcadores de monocitos (CD14) y células de Langerhans (CD1a) se mantuvieron bajas.

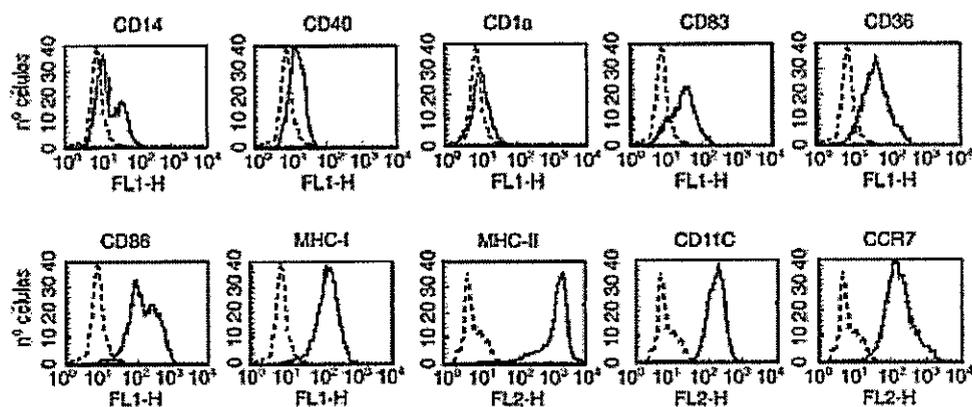


Figura 2. Propiedades fenotípicas de células dendríticas maduras en el día 7 de cultivo. Los histogramas representan la expresión de marcadores de superficie marcadas con anticuerpos conjugados y analizadas por citometría de flujo. Las células fueron tratadas como se describe en materiales y métodos. El control de isotipo se presenta en líneas punteadas mientras que las líneas continuas representan las condiciones con los respectivos anticuerpos.

Una vez terminado el proceso de generación de células dendríticas maduras, se cultivaron estas células durante 5 horas a 37°C en presencia de los distintos péptidos a una concentración de 10 µg/ml cada uno para inducir líneas de linfocitos péptido-específicas.

4. Generación de líneas CTL péptido-específicas

a) Generación de líneas de linfocitos T CD8⁺ específicos para los péptidos de MC1R nativos mediante estimulaciones con DCs.

En trabajos anteriores, Salazar-Onfray y col. lograron generar líneas celulares citotóxicas específicas contra secuencias peptídicas derivadas de MC1R: MC1R 244 (TILLGIFFL), MC1R 283 (FLALIICNA) y MC1R 291 (AIIDPLIYA), capaces de reconocer líneas de melanomas que sobre-expresan el receptor MC1R (Salazar-Onfray y col., 1997).

Se utilizó el protocolo escrito en materiales y métodos para la generación de linfocitos T específicos contra antígenos tumorales modificados. En primera instancia se generaron líneas para los péptidos nativos de MC1R a partir de donantes normales HLA-A2.1 con el fin de reproducir el método. Para esto se estimuló el PBL de donantes normales con DCs y monocitos autólogos pulsados con los distintos péptidos de MC1R (MC1R 244, MC1R 283 y MC1R 291). Se realizaron dos estimulaciones sucesivas con DCs seguida de tres estimulaciones sucesivas con monocitos separadas por un lapso de 10 días entre cada estimulación. La figura 3 muestra un cultivo en una etapa media del protocolo en donde se pueden observar células presentadoras y linfocitos haciendo contacto con ellas.



Figura 3. Fotografía de un cultivo de linfocitos y células dendríticas. Para obtener esta fotografía, se aplicó el protocolo descrito en materiales y métodos. Sobre la base de su morfología, se pueden apreciar células dendríticas haciendo contacto con linfocitos.

La especificidad de las líneas de linfocitos generadas fue evaluada mediante un ensayo de ELISpot, 5 días después de haber realizado la segunda estimulación con DCs autólogas pulsadas con los respectivos péptidos (Figura 4). En este caso el ensayo de ELISpot mide el IFN- γ producido por los linfocitos T cuando reconocen un antígeno. En la placa de ELISpot se incuban las células efectoras, células blanco y péptido relevante o irrelevante según corresponda. En el fondo de la placa se ven puntos producidos por una reacción colorimétrica mediado por una enzima acoplada a un anticuerpo secundario en presencia de un sustrato. Cada punto refleja células que producen INF- γ . Al contar los puntos obtenidos para cada condición se determina si existen diferencias significativas o no entre ellas estableciéndose la especificidad relativa de las líneas

Para la línea generada a partir del péptido MC1R 244 se aprecia especificidad y lo mismo ocurre con las líneas generadas a partir de los péptidos 283 y 291 de MC1R, ya que son capaces de reconocer selectivamente a células T2 pulsadas con el péptido relevante correspondiente, y no reconoce células T2 sin pulsar con péptido o pulsadas con algún péptido irrelevante en dos donantes (Figura 4). Estas líneas fueron analizadas luego de haber realizado 2 estimulaciones con DCs, lo que corresponde a 15 días de cultivo. Se observa que los tres péptidos analizados fueron capaces de inducir líneas de linfocitos T CD8⁺ específicas para los péptidos utilizados en la estimulación pero no para péptidos controles irrelevantes lo que valida el método de inducción de líneas péptido-específicas en el donante 1 (Figura 4A). A partir del PBL del donante 2 solo se logró inducir una línea péptido específica para el péptido MC1R 291 mientras que el péptido MC1R 244 generó una línea inespecífica (Figura 4B)

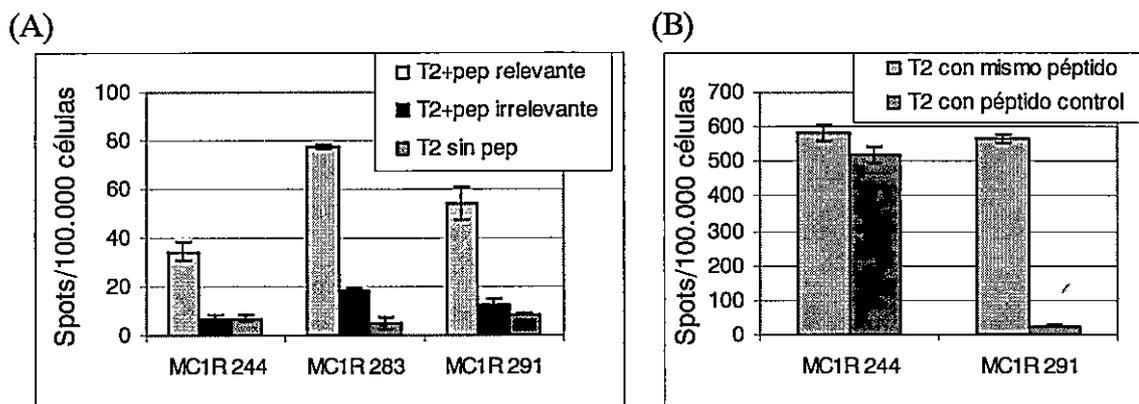


Figura 4. Respuesta péptido-específica de linfocitos T CD8⁺ estimulados con DCs cargadas con péptidos nativos derivados de MC1R. Ensayo de ELISpot para las líneas de linfocitos T citotóxicos que mide la especificidad después de recibir dos estimulaciones con DCs para el donante n°1 (A) y para el donante n°2 (B). Los datos se cuantifican como número de puntos cada 100.000 células sembradas por pocillo, donde cada punto refleja una colonia secretora de interferón gamma.

Seguidamente las líneas específicas se mantuvieron en cultivo y fueron estimuladas adicionalmente. Luego de completado el protocolo que incluyó además de las dos estimulaciones con DCs, tres estimulaciones sucesivas con monocitos autólogos pulsados con los respectivos péptidos, se procedió a enriquecer la población de linfocitos T CD8⁺ mediante selección positiva usando microbeads anti-CD8. Posteriormente se evaluó el proceso de enriquecimiento mediante citometría de flujo, identificando el porcentaje de células CD3⁺ CD8⁺ comparado con otras etapas del proceso (Figura 5).

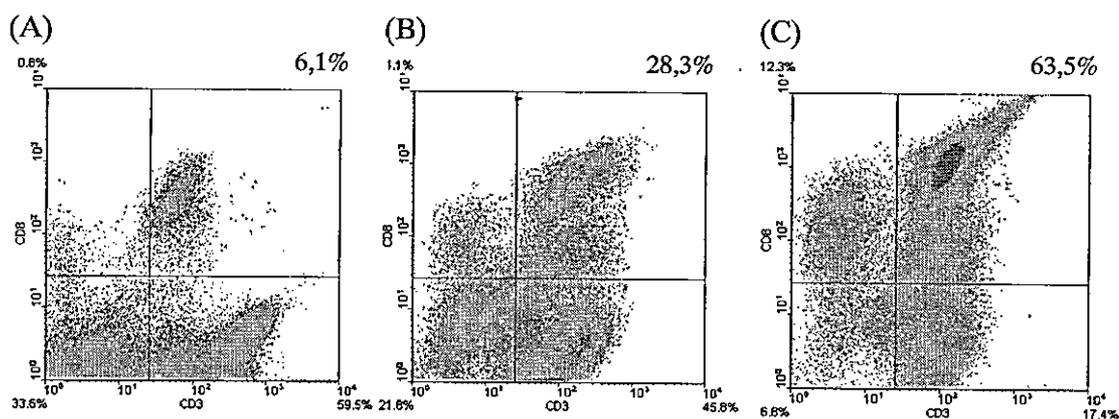


Figura 5. Enriquecimiento de la población de células CD3⁺ CD8⁺ en distintas etapas del proceso de generación de líneas CTL. Se tomaron muestras representativas de los cultivos celulares en distintas etapas del proceso de inducción A) PBMC fresco (B) linfocitos no seleccionados y (C) seleccionados positivamente mediante microbeads anti-CD8 luego de completado el protocolo de estimulaciones. Las células se tiñeron con anticuerpos conjugados anti-CD3 y anti-CD8. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

Se observa que a lo largo del proceso, la población de células CD8⁺ en cultivo va creciendo con respecto a otras poblaciones y que luego de la selección positiva mediante microbeads anti-CD8, el porcentaje de células CD3⁺ CD8⁺ es cercano al 65%. El fabricante del kit de purificación recomienda pasar las células 2 veces por la columna de separación para lograr un porcentaje mayor de pureza, pero nosotros decidimos hacerlo una sola vez ya que está descrito que los linfocitos T CD8⁺ necesitan del contacto con otro tipo de células, como las T CD4⁺ para proliferar (Janssen y col., 2003). Esto nos permite además mantener el cultivo por un tiempo prolongado, en comparación con un cultivo de linfocitos CD8⁺ puros.

Posteriormente, se realizó un ensayo de ELISpot para evaluar la especificidad de las líneas de linfocitos T CD8⁺ producidas mediante estimulaciones con DC cargadas con péptidos según la concentración de péptido presente (Figura 6).

Para cumplir con este objetivo, se procedió a generar líneas específicas de linfocitos T citotóxicos para los péptidos MC1R 291-a y MC1R 291-b, considerando que éstos presentan una mayor afinidad para la molécula HLA-A2.1 que el péptido original de MC1R, según los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* utilizando células T2 (Figura 1). El resto de los péptidos modificados no fueron utilizados por presentar una menor afinidad empírica.

Se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente para generar líneas celulares contra péptidos nativos. Se procedió entonces a estimular PBL de donantes normales con DCs autólogas pulsadas con los péptidos MC1R 291-a y MC1R 291-b. La segunda estimulación se hizo 10 días después de la primera estimulación, y las siguientes estimulaciones se realizaron con monocitos pulsados con los respectivos péptidos también dejando pasar 10 días entre cada estimulación y alimentando con medio suplementado con IL-2 e IL-7. Se completó así el protocolo de estimulación que consiste en 2 estimulaciones con células dendríticas y 3 estimulaciones con monocitos.

Durante el proceso de generación de linfocitos específicos, se realizaron ensayos de ELISpot para medir la especificidad de las líneas en cultivo.

Es necesario recordar que la idea central de este trabajo es por una parte comprobar que las líneas generadas son específicas para el péptido modificado de MC1R con cual se generaron (MC1R 291-a y MC1R 291-b), y por otra parte también analizar si éstas son capaces de reconocer el péptido nativo de MC1R (MC1R 291) ya que este péptido es presentado en la superficie de células de melanoma que sobreexpresan MC1R (aproximadamente el 60% de los melanomas sobreexpresan

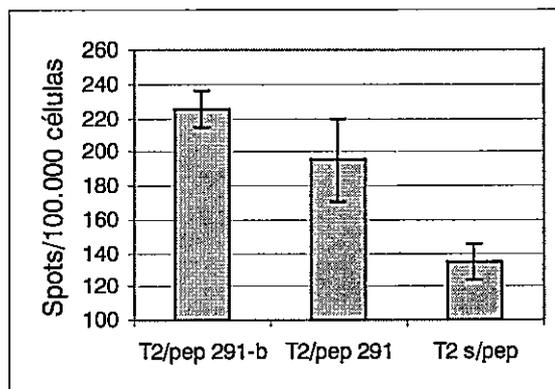
MC1R) en pacientes de isotipo HLA-A2.1 de la molécula MHC clase I.

5. Evaluación de especificidad de la línea anti-MC1R 291-a y anti-MC1R 291-b

Para esto se realizó un ensayo de ELISpot en el cual se utilizaron como blanco células T2 cargadas exógenamente con el péptido MC1R 291-a, MC1R 291-b y MC1R 291 nativo. Las células efectoras, fueron los linfocitos generados con el péptido MC1R 291-a y MC1R 291-b obtenidos de dos donantes, donante 3 y donante 4.

Lamentablemente las líneas estimuladas con el péptido MC1R 291-a no mostraron especificidad alguna en los ensayos de ELISpot ya que no se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones. Este fue motivo para no seguir estimulando estas líneas y descartarlas para futuros ensayos. Sin embargo se observa que para ambos donantes las líneas generadas con el péptido MC1R 291-b son capaces de reconocer tanto al péptido modificado como al péptido nativo, pero no a células T2 en ausencia de péptidos (figura 7A y 7B). Lo que indica que para éste péptido las modificaciones en los motivos de anclaje pueden mantener la especificidad aumentando la afinidad a la molécula MHC clase I.

(A)



(B)

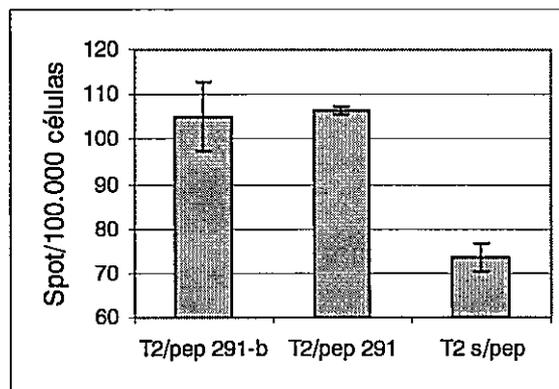


Figura 7. Linfocitos T específicos para péptidos modificados derivados de MC1R 291 pueden reconocer péptidos nativos. CTL derivados del donante 3 (A) y del donante 4 (B) obtenidos luego de 2 estimulaciones con DCs, fueron evaluados para su especificidad para péptidos modificados y nativos a través de un ensayo ELISpot. Los puntos fueron cuantificados y graficados como colonias formadoras de spots cada 100.000 células sembradas.

Luego de completar el protocolo de estimulaciones de estas líneas, el paso siguiente fue comprobar la especificidad de una de las líneas $CD8^+$ anti-MC1R 291-b enriquecida mediante microbeads anti- $CD8$, con el fin de demostrar que las células T $CD8^+$ son las mediadoras del reconocimiento de los antígenos. El resultado obtenido de un ensayo de ELISpot se muestra en la figura 8, en donde se ve que la línea CTL anti-MC1R 291-b enriquecida mediante selección positiva de $CD8$ es capaz de reconocer tanto el péptido modificado MC1R 291-b como el péptido original MC1R 291, cuando es expresado en el contexto del isotipo HLA-A2.1 en la superficie de células presentadoras (Figura 8). Cabe hacer notar que si se igualan las escalas de los gráficos de la figura 7 con la figura 8, la especificidad de las líneas obtenidas luego del enriquecimiento es tres veces mayor que las no seleccionadas (equivalente a 300 spots/ 10^5 células) (figura 8) comparadas con las líneas sin enriquecer (aproximadamente

100 spots/ 10^5 células) (figura 7B), lo que sugiere la implicancia de los linfocitos CD8+ en el reconocimiento de los antígenos peptídicos.

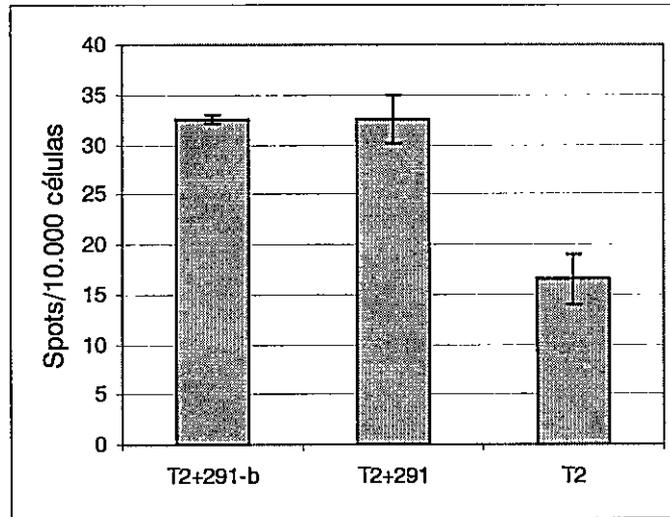


Figura 8. Línea enriquecida de linfocitos T específicos para péptidos modificados derivados de MC1R 291 pueden reconocer péptidos nativos con mayor frecuencia. Los linfocitos T obtenidos luego completar el protocolo de estimulaciones fueron enriquecidos para CD8 mediante Microbeads anti-CD8 y luego evaluados en su capacidad para reconocer selectivamente células T2 cargadas con el péptido original de MC1R y también con el mismo péptido modificado, a través de un ensayo ELISpot. Los puntos son cuantificados y graficados como colonias formadoras de spots cada 10.000 células sembradas.

Luego de demostrar que el péptido MC1R 291-b es capaz de inducir linfocitos T citotóxicos que reconocen el péptido MC1R 291 original unido a HLA-A2.1 en la superficie de células T2, determinamos la avidéz y vida media de la interacción péptido/MHC estudiando cuanto tiempo dura el complejo p-MHC clase I en la superficie de éstas células, mediante un experimento de cinética. Las células T2 fueron mantenidas en cultivo y estudiadas a distintos tiempos para proceder a medir los niveles de estabilización de HLA-A2.1 en la superficie celular mediante citometría de flujo (Figura 9).

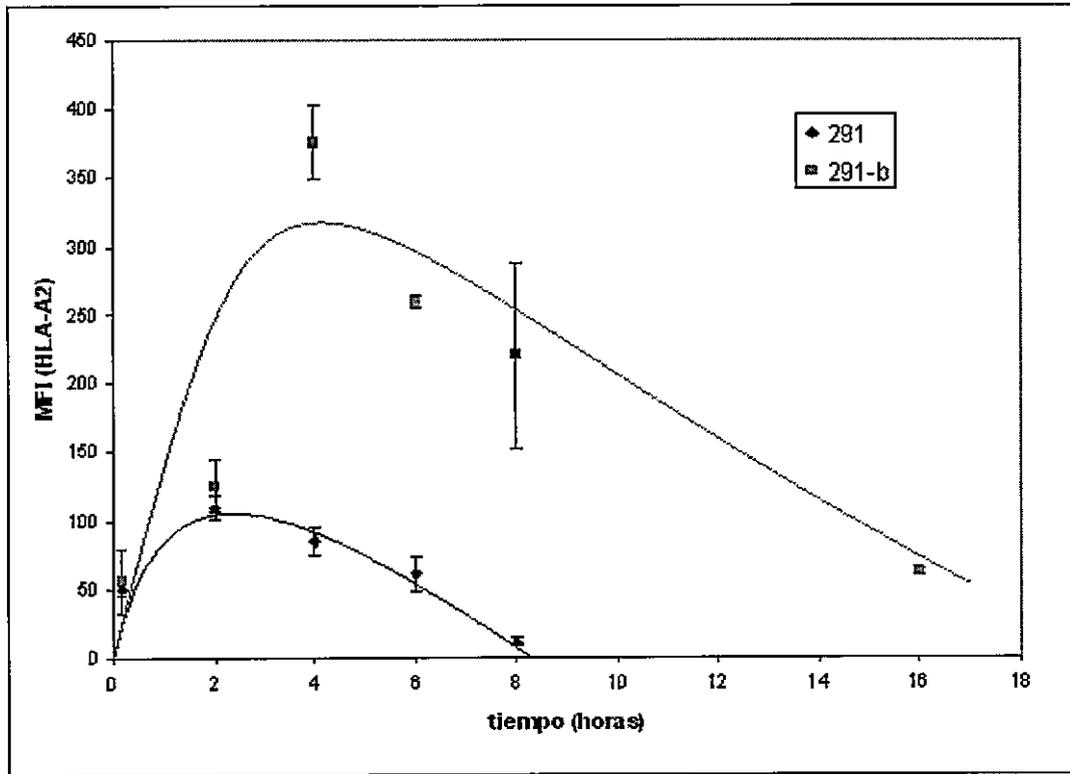


Figura 9. Duración del complejo péptido-HLA-A2.1 para los péptidos 291 y 291-b en la superficie de células T2. Se incubaron células T2 en presencia de distintos péptidos a una concentración de 10 ug/ml y se midió la expresión de MHC clase I a distintos tiempos de cultivo mediante citometría de flujo.

Se puede observar que el complejo péptido MC1R 291-b/HLA-A2.1 se encuentra por más tiempo que el complejo péptido MC1R 291/HLA-A2.1 en la superficie de células T2, ya que a las 8 horas de cultivo el complejo péptido MC1R 291 nativo es incapaz de mantener la estabilización del HLA-A2.1 en la membrana celular lo que indica que ya no se encuentra presente, mientras que el complejo péptido MC1R 291-b/HLA-A2.1 se mantiene por más de 16 horas de incubación, el doble que el tiempo del péptido nativo. Por otra parte los niveles expresión observados en este ensayo indican que a la misma concentración el péptido modificado logra estabilizar más moléculas

HLA-A2.1 lo que comprueba su mayor avidez. Esto estaría demostrando que el péptido MC1R 291-b podría constituirse en un mejor péptido antigénico ya que logra inducir el reconocimiento del péptido nativo junto con aumentar la afinidad por el MHC lo que aumentaría la oportunidad de encuentro entre la célula presentadora y el linfocito T específico.

Por último se decidió estudiar si líneas de linfocitos T CD8⁺ inducidas con el péptido MC1R 291-b eran capaces de reconocer melanomas HLA-A2.1 que expresan MC1R nativo, lo que le otorgaría a este neo-antígeno un potencial inmunoterapéutico. Para esto se co-cultivaron en una placa de ELISpot, una línea CTL anti MC1R 291-b generada a partir de un 5º donante con distintos blancos, incluidas tres líneas de melanoma que co-expresan HLA-A2.2 y MC1R (Figura 10).

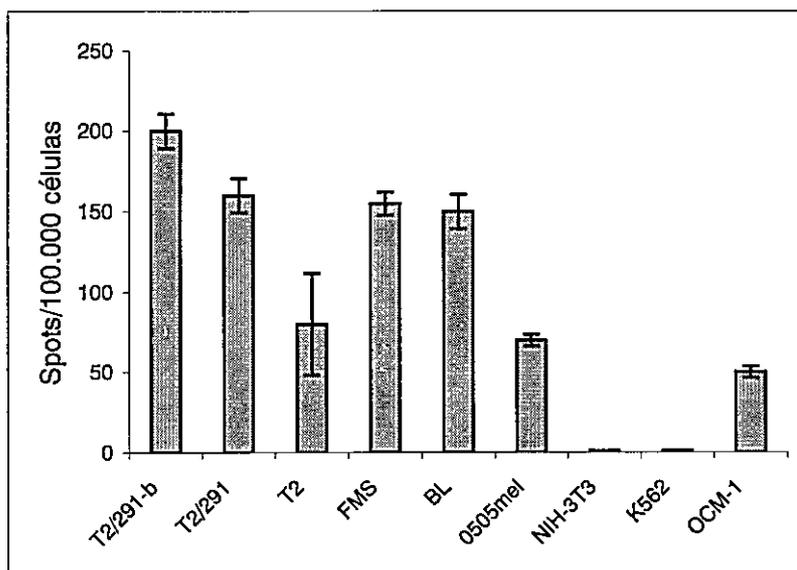


Figura 10. Linfocitos CD8⁺ inducidos con el péptido modificado MC1R 291b son capaces de reconocer células de melanoma. Los linfocitos T obtenidos luego de completado el protocolo de estimulaciones sucesivas con DCs y monocitos y enriquecidos mediante Microbeads anti-CD8 fueron evaluados en su capacidad para reconocer selectivamente células T2 cargadas con el péptido modificado de MC1R y también con el péptido original, además de líneas de melanoma HLA-A2.1⁺ que expresan MC1R (FMS, BL), melanomas que no expresan MC1R (0505mel), melanomas HLA-A2.1⁻ que expresan MC1R (OCM1), y la línea murina de fibroblastos NIH 3T3 y el prototipo sensible a NK humano (K562).

La capacidad de la línea CD8⁺ de reconocer melanomas que co-expresan tanto MC1R como la molécula HLA-A2.1 indica que el péptido modificado MC1R 291-b es capaz de inducir linfocitos péptido-específicos capaces de reconocer antígenos naturales lo que otorga un potencial terapéutico a este péptido.

De esta forma en este trabajo se demuestra que las líneas de linfocitos T citotóxicos generadas con el péptido MC1R 291-b, un péptido con afinidad aumentada para la molécula HLA-A2.1, son capaces de reconocer células T2 pulsadas con el péptido sintético nativo de MC1R, y además reconocen péptido naturalmente procesados y presentados en la superficie de líneas de melanoma HLA-A2.1 que expresan MC1R

(FMS, BL) y no los controles de especificidad tales como: células T2 sin péptido, líneas de melanoma que no expresan MC1R, líneas de melanoma que no son HLA-A2.1⁺ (OCM-1), ni tampoco K562 lo que descarta actividad NK, ni fibroblastos de ratón (NIH-3T3).

DISCUSIÓN

Las terapias contra el cáncer que emplean péptidos tumorales, consisten básicamente en cargar células dendríticas maduras autólogas con distintos péptidos correspondientes a antígenos tumorales y reinyectarlas en pacientes (Lazoura E, and Apostolopoulos V., 2005). El isotipo MHC clase I del paciente debe ser compatible con los péptidos utilizados y esta técnica ha demostrado tener una amplia eficacia en países donde se ha implementado. Los péptidos que se utilizan normalmente para tratar melanoma son los derivados de los antígenos asociados a melanoma Mage-3, gp100, tirosinasa y Mart-1/Melan A (Schadendorf y col., 2001, Riley y col., 2003, Nestle y col., 1998).

MC1R es un antígeno expresado en aproximadamente el 60% de todos los melanomas cutáneos y en el 100% de los melanomas oculares (Salazar-Onfray y col. 2002, López y col., 2006), por lo tanto sería un blanco adecuado para inducir al sistema inmune a generar respuestas en contra este antígeno mediado por CTL específicos contra péptidos derivados de MC1R (Salazar-Onfray y col., 1997).

En estudios anteriores nuestro grupo demostró que tres péptidos derivados de MC1R; MC1R 244, MC1R 283 y MC1R 291 eran capaces de generar líneas de linfocitos T citotóxicos péptido específicos que reconocen células de melanoma que expresan MC1R y el isotipo HLA-A2+ constituyéndose en buenos candidatos para utilizarse en inmunoterapia basada en células dendríticas que emplean péptidos tumorales como antígenos (Salazar-Onfray y col., 1997). Los péptidos derivados de MC1R poseen una afinidad intermedia para la molécula HLA-A2.1 lo que explicaría en

cierto modo su debilidad antigénica. Si bien es cierto antígenos derivados de MC1R pueden ser encontrados en TIL de pacientes con melanoma (Salazar-Onfray, tesis doctoral, 1998) y en la depigmentación producida en lesiones de pacientes con melanoma (Wankowicz-Kalinskaa, y cols, 2006). Es claro que poseen una avidéz baja en comparación a otros antígenos melanosomales (Wankowicz-Kalinskaa, y cols., 2006). Es por esto que nos planteamos la posibilidad de mejorar la afinidad de los antígenos derivados de MC1R con el fin de aumentar el tiempo de presentación de este péptido en la superficie de células dendríticas para inducir respuestas MC1R específicas (Zehn y cols, 2004). Esto permitiría activar *in vivo*, una mayor cantidad de linfocitos T citotóxicos y así lograr una respuesta antitumoral más fuerte. Claro está que para generar una respuesta contra el melanoma es necesario que los linfocitos generados con el péptido modificado reconozcan también al péptido nativo, el que es naturalmente presentado por las células tumorales.

Mediante la utilización de distintos algoritmos computacionales analizamos el potencial de afinidad de varios péptidos modificados análogos a los antígenos derivados de MC1R. Una vez comparados en su afinidad se procedió a comprobar en forma empírica la capacidad de estos péptidos sintéticos para ligar la molécula HLA-A2.1. El isotipo HLA-A2.1 es el más común en la población caucásica, estando presente en un 50% de la población (Middleton y cols., 2000). En los pacientes con melanoma ocurre algo similar, por lo que diseñar vacunas que utilicen péptidos restringidos a HLA-A2.1 permite abarcar una importante población de pacientes con melanoma (Player y col., 1996). En este estudio, generamos linfocitos T a partir de sangre periférica (PBL) de donantes normales HLA-A2.1⁺, los que fueron estimulados con células dendríticas

pulsadas con distintos péptidos derivados del antígeno MC1R. Posteriormente medimos la capacidad de estas líneas de reconocer selectivamente a células blanco pulsadas con péptidos relevantes, péptidos irrelevantes y células blanco sin péptido, demostrando la especificidad de la respuesta anti-péptido.

Para inducir linfocitos T péptido-específicos utilizamos células dendríticas autólogas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica, basándonos en un protocolo establecido anteriormente (Sallusto y Lanzavecchia, 1994) y adaptado en nuestro laboratorio, que permite obtener un buen rendimiento celular del fenotipo funcional maduro, con capacidad de producir una eficiente estimulación de linfocitos T. Dicha estimulación se realizó en presencia de las citoquinas IL-12, IL-6, IL-2 e IL-7, que favorecen la generación de linfocitos T citotóxicos (Riley y col., 2003).

Los cultivos de DCs obtenidos presentaron un fenotipo característico de células dendríticas maduras (Figura 2). Estas DCs maduras fueron capaces de presentar péptidos y generar linfocitos T con especificidad para varios péptidos derivados de MC1R, detectándose sólo actividad residual frente a péptidos irrelevantes, comparado con la potente respuesta contra células T2 cargadas con los péptidos relevantes para cada línea. Lo que es más importante aún, se lograron generar líneas CTL con un péptido modificado de MC1R 291 (MC1R 291-b) cuya afinidad y permanencia en el tiempo asociado a la molécula HLA-A2.1 está aumentada en comparación con el péptido MC1R 291 natural. Adicionalmente, estos linfocitos generados contra el péptido modificado son capaces de reconocer específicamente a células que presentan el péptido MC1R normal tanto sintético en las células T2 como naturalmente procesados en células de

melanoma.

Estos resultados demuestran que el protocolo implementado para generar líneas específicas de CTL funcionó correctamente, siendo la respuesta dependiente básicamente de la afinidad de los péptidos utilizados y de la antigenicidad de dichos péptidos. En este trabajo también comprobamos que uno de los péptidos modificados es capaz de generar CTLs que reconocen al péptido original de MC1R *in vitro*, lo cual lo convierte en un buen candidato para generar este tipo de respuestas *in vivo*.

Resultaría interesante evaluar la respuesta inmune antitumoral que confiere este péptido de MC1R modificado en protocolos clínicos. Se ha experimentado con los péptidos gp100 y MART-1 modificados que han mostrado mejoradas respuestas inmunológicas en pacientes con melanoma (Markovic y col., 2006, Linette y col., 2005). De todas formas la eficacia clínica de la utilización de inmunizaciones con un solo epítipo podría ser contraproducente induciendo probablemente selección de variantes mutadas del tumor lo que permitiría la evasión tumoral a la respuesta inmune (Brinkman y cols., 2004). Es por ello que en general se están utilizando inmunizaciones con DCs cargadas con lisados tumorales que cubrirían una gama de antígenos más amplia (Escobar y cols., 2005) o con un grupo de antígenos (Valmori y cols., 2003). La modificación de péptidos antigénicos derivados de MC1R para aumentar la avidéz al MHC clase I podría contribuir al diseño de protocolos de inmunoterapia contra el melanoma maligno basado en múltiples antígenos, que por ahora podrían incluir al péptido MC1R 291-b no descartándose modificaciones aún no estudiadas en otros péptidos antigénicos derivados de MC1R .

CONCLUSIONES

- El péptido MC1R 291-b presenta una mayor afinidad por la molécula HLA-A2.1, que el péptido MC1R 291 nativo
- Líneas de Linfocitos T generados con el péptido MC1R 291-b son capaces de reconocer células T2 cargadas exógenamente con el péptido nativo MC1R 291
- Líneas de Linfocitos T generados con el péptido MC1R 291-b son capaces de reconocer células de melanoma HLA-A2 que expresan MC1R.
- El péptido 291-b es un buen candidato para ser utilizado en inmunoterapia de melanoma.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Malek Z, Scott MC, Suzuki I, Tada A, Im S, Lamoreux L, Ito S, Barsh G, Hearing VJ. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res.* 2000;13 Suppl 8:156-62.
- Andersen ML, Ruhwald M, Thorn M, Pedersen AE, Mathiassen S, Buus S, Claesson MH. Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling as tumor rejection epitopes. *J Immune Based Ther Vaccines.* 2003 Jan 29;1(1):1.
- Barth RJ, Jr., Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* 1991;173:647
- Bhardwaj R, Becher E, Mahnke K, Hartmeyer M, Schwarz T, Scholzen T, Luger TA. Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J Immunol.* 1997 Apr 1;158(7):3378-84.
- Bohm M, Metze D, Schulte U, Becher E, Luger TA, Brzoska T. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ. *Exp Dermatol.* 1999 Dec;8(6):453-61.
- Boon T, Gajewski TF, Coulie PG. From defined human tumor antigens to effective immunization?. *Immunol Today.* 1995; 16:334.
- Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:337-65.
- 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 Aug 1;178(2):489-95.
- Brinkman JA, Fausch SC, Weber JS, Kast WM. Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy. 1: *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4:181-98.
- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.
- Catania A, Rajora N, Capsoni F, Minonzio F, Star RA, Lipton JM. The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides.* 1996;17(4):675-9.
- Celis E, Tsai V, Crimi C, DeMars R, Wentworth PA, Chesnut RW, Grey HM, Sette A, Serra HM. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar

15;91(6):2105-9.

Chhajlani V, Wikberg JE. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* 1992 Sep 14;309(3):417-20. Erratum in: *FEBS Lett.* 1996 Jul 22;390(2):238.

Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Jan;(262):3-11.

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 Jul 1;180(1):35-42.

Gallagher RP, Elwood JM, Hill GB. Risk factors for cutaneous malignant melanoma: the Western Canada Melanoma Study. *Recent Results Cancer Res.* 1986;102:38-55.

Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethe B, Brasseur F, Boon T. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1994 Mar 1;179(3):921-30.

Green A, Battistutta D.. Incidence and determinants of skin cancer in a high-risk Australian population. *Int J Cancer.* 1990 Sep 15;46(3):356-61.

Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, et al. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255:1261-1263, 1992.

Hunt G, Donatien PD, Lunec J, Todd C, Kyne S, Thody AJ. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. *Pigment Cell Res.* 1994 Aug;7(4):217-21.

Jaffee EM, Pardoll DM. Murine tumor antigens: is it worth the search? *Curr Opin Immunol.* 1996 Oct;8(5):622-7.

Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature.* 2003 Feb 20;421(6925):852-6.

Kawakami Y (a), 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 Jul 5;91(14):6458-62.

Kawakami Y (b), 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 Apr 26;91(9):3515-9.

Kawakami Y (c), 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 Jul 1;180(1):347-52.

Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E, Rosenberg SA. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol.* 1995 Apr 15;154(8):3961-8.

Klein G, Sjogren HO, Klein E, Hellstrom KE. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.* 1960 Dec;20:1561-72.

Lawson DH. Update on the systemic treatment of malignant melanoma. *Semin Oncol.* 2004 Apr;31(2 Suppl 4):33-7.

Lazoura E, Apostolopoulos V. Rational Peptide-based vaccine design for cancer immunotherapeutic applications. *Curr Med Chem.* 2005;12:629-39.

López MN, Pereda C, Ramírez M, Mendoza-Naranjo A, Serrano A, Ferreira A, Poblete R, Kalergis A, Kiessling R, and Salazar-Onfray, F. Melanocortin 1 Receptor is expressed by uveal malignant melanoma and can be considered a new target for diagnosis and immunotherapy. Aceptado para publicación IOVS

Maecker B, von Bergwelt-Baildon, Anderson KS, Vonderheide RH, Schultze JL. Linking genomics to immunotherapy by reverse immunology--'immunomics' in the new millennium. *Curr Mol Med.* 2001 Nov;1(5):609-19.

Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, Sherr DH, Nadler LM, Schultze JL. Identification of a new HLA-A*0201-restricted cryptic epitope from CYP1B1. *Int J Cancer.* 2005 Jun 10;115(2):333-6.

Markovic SN, Suman VJ, Ingle JN, Kaur JS, Pitot HC, Loprinzi CL, Rao RD, Creagan ET, Pittelkow MR, Allred JB, Nevala WK, Celis E. Peptide vaccination of patients with metastatic melanoma: improved clinical outcome in patients demonstrating effective immunization. *Am J Clin Oncol.* 2006 29:352-60.

Mathiassen S, Lauemoller SL, Ruhwald M, Claesson MH, Buus S. Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling induce protective anti-tumor immunity. *Eur J Immunol.* 2001 Apr;31(4):1239-46.

Medina E, Kaempffer AM. Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations. *Rev Med Chil.* 2001 Oct;129(10):1195-202.

Meidenbauer N, Marienhagen J, Laumer M, Vogl S, Heymann J, Andreesen R, Mackensen A. Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):2161-9

Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, Nascimento E, Briceno I, Perez MP. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol.* 2000;61:1048-52.

Novellino L, Castelli C, Giorgio Parmiani. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update REVIEW *Cancer Immunol Immunother* (2005) 54: 187-207

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998 Mar;4(3):328-32.

Phan GQ, Touloukian CE, Yang JC, Restifo NP, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J Immunother.* 2003 Jul-Aug;26(4):349-56.

Player MA, Barracchini KC, Simonis TB, Rivoltini L, Arienti F, Castelli C, Mazzocchi A, Belli F, Parmiani G, Marincola FM. Differences in frequency distribution of HLA-A2 subtypes between North American and Italian white melanoma patients: relevance for epitope specific vaccination protocols. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996;19:357-63

Programa Nacional de Cáncer. Ministerio de Salud. Chile. Página web <http://deis.minsal.cl/indexmc.asp>

Redondo P. Update on melanoma: incidence, development and biological aspects. *An Sist Sanit Navar.* 2000 Jan-Apr;23(1):67-84.

Riley JP, Rosenberg SA, Parkhurst MR. Stimulation of tumor-reactive T lymphocytes using mixtures of synthetic peptides derived from tumor-associated antigens with diverse MHC binding affinities. *J Immunol Methods.* 2003 May 1;276(1-2):103-19.

Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 1986 Sep 19;233(4770):1318-21.

Salazar-Onfray F, Lopez M, Lundqvist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A, Korenblit C, Petersson M, Chhajlani V, Larsson O, Kiessling R. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer*. 2002 Aug 12;87(4):414-22.

Salazar-Onfray F, Nakazawa T, Chhajlani V, Petersson M, Karre K, Masucci G, Celis E, Sette A, Southwood S, Appella E, Kiessling R. 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*. 1997 Oct 1;57(19):4348-55.

Salazar-Onfray F, Tumor recognition by cytotoxic T cells: Definition of new antigens and the effect of Interleukin-10 on antigen presentation. Tesis doctoral 1998.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1109-18.

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

Schadendorf D, Nestle FO. Autologous dendritic cells for treatment of advanced cancer-an update. *Recent Results Cancer Res*. 2001;158:236-48.

Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol*. 1998 (2-3):81-96.

Slingluff CL Jr, Cox AL, Henderson RA, Hunt DF, Engelhard VH. Recognition of human melanoma cells by HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes is mediated by at least six shared peptide epitopes. *J Immunol*. 1993 Apr 1;150(7):2955-63.

Star RA, Rajora N, Huang J, Stock RC, Catania A, Lipton JM. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 15;92(17):8016-20.

Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA. Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology*. 1996 May;137(5):1627-33.

Taherzadeh S, Sharma S, Chhajlani V, Gantz I, Rajora N, Demitri MT, Kelly L, Zhao H, Ichiyama T, Catania A, Lipton JM. alpha-MSH and its receptors in regulation of tumor necrosis factor-alpha production by human monocyte/macrophages. *Am J Physiol*. 1999 May;276(5 Pt 2):R1289-94.

Tanzarella S, Russo V, Lionello I, Dalerba P, Rigatti D, Bordignon C, Traversari C. Identification of a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family. *Cancer Res.* 1999 Jun 1;59(11):2668-74.

Tatro JB, Atkins M, Mier JW, Hardarson S, Wolfe H, Smith T, Entwistle ML, Reichlin S. Melanotropin receptors demonstrated in situ in human melanoma. *J Clin Invest.* 1990 Jun;85(6):1825-32.

Tong JC, Tan TW, Ranganathan S. Methods and protocols for prediction of immunogenic epitopes. *Brief Bioinform.* 2006 Oct 31.

Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med.* 1995 ;182:689-98.

Vanky F. Membrane structures involved in auto-tumor recognition. *Biochim Biophys Acta.* 1986 ;865(3):253-65.

Valmori D, Dutoit V, Ayyoub M, Rimoldi D, Guillaume P, Lienard D, Lejeune F, Cerottini JC, Romero P, Speiser DE. Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multi-peptide melanoma vaccine. 1: *Cancer Immun.* 2003;3:15.

Wankowicz-Kalinska A, Mailliard RB, Olson K, Graham F, Edington H, Kirkwood JM, Martinek S, Das PK, Storkus WJ. 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.* 2006 16:165-74.

Xia Y, Muceniece R, Wikberg JE. Immunological localisation of melanocortin 1 receptor on the cell surface of WM266-4 human melanoma cells. *Cancer Lett.* 1996 Jan 2;98(2):157-62.

Zehn D, Cohen CJ, Reiter Y, Walden P. Extended presentation of specific MHC-peptide complexes by mature dendritic cells compared to other types of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2004 Jun;34(6):1551-60.