
Péptidos inmunomoduladores, derivados de antígenos asociados a melanoma, con actividad antitumoral

Immuno-modulatory peptides, derived from antigens associated with melanoma, with anti-tumourous activity

A. Pérez-Díez, A. Martínez-Crespo, N. López-Moratalla

INTRODUCCIÓN

Los tumores son susceptibles al ataque del sistema inmunitario del huésped si poseen una diana antigénica. Se ha descrito que la enzima tirosinasa y las proteínas codificadas por la familia de genes MAGE (gen de antígeno de melanoma), expresadas en melanomas, contienen epítomos reconocibles por los linfocitos T8 citotóxicos^{1,2} a través de su presentación en moléculas concretas de HLA de clase I. Algunos de estos antígenos tienen además epítomos reconocibles por los linfocitos T4³, por lo que los tumores que los expresan son también diana de estas células citotóxicas.

Toda respuesta inmunitaria mediada por células T requiere presentación de antígenos por lo que las células presentadoras de antígenos (APC), entre las que se encuentran los monocitos maduros circulantes, tienen un papel clave en la puesta en marcha y regulación de la respuesta antitumoral⁴. La consideración de las observaciones acerca de la contribución de las subpoblaciones de monocitos activados y diferenciados en la respuesta inmune antitumoral nos ha llevado a estu-

diar si fragmentos de los antígenos asociados a melanomas, por poseer una determinada estructura, pueden tener algún efecto sobre los monocitos, que les permita presentarlos a linfocitos T; con ello se originaría un tipo de respuesta que podría dar cuenta de la propiedad de estas proteínas de ser antígenos de rechazo tumoral.

Hemos diseñado péptidos con secuencias presentes en los antígenos de melanoma, tirosinasa y de los de la serie MAGE, teniendo presente observaciones previas⁵⁻⁷ acerca de que péptidos con un motivo estructural común y con secuencias presentes en diversas proteínas, tienen un carácter inmunopotenciador manifestado por su capacidad de activar monocitos⁵⁻⁷ y de inducir una respuesta mediada por las células T helper de tipo 1 (Th1)⁸. Los resultados muestran que los péptidos objeto de este estudio incrementan la liberación de las monoquinas IL-1 α , TNF α y IL-6, así como las citoquinas de las células Th1 IL-2 e IFN γ ; inducen cambios en el fenotipo de los monocitos hacia una subpoblación que expresa la forma inducible de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) y hacia monocitos citotóxicos, con una proteína con activi-

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 25-31.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

Correspondencia:

Natalia López Moratalla
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Navarra
Apartado 177
Tfno. 948 425600
Fax 948 425649

dad DNasa en los gránulos de secreción y capacidad de lisar células de melanoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han sintetizado 13 péptidos de 15 aminoácidos siguiendo el método de fase sólida⁹.

Las células linfomononucleares de sangre periférica (PBMC) proceden de donantes sanos y fueron separadas del resto de las células sanguíneas mediante la técnica descrita por Boyun¹⁰. El medio de cultivo de esta población celular es RPMI 1640 con HEPES 36 mM, L-glutamina 2mM y penicilina y estreptomycin. Al medio de cultivo se añadió el péptido a una concentración final de 30 mg/10⁶ células. Las incubaciones se realizaron siempre a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Los monocitos se separaron del resto de las células por adherencia al plástico de los frascos de cultivo, tras la incubación de las PBMC.

La citotoxicidad dependiente de monocitos se ha determinado según la técnica descrita por Meltzer¹¹, utilizando como células efectoras monocitos purificados y como células diana la línea celular HT-29 y las AC y BB, obtenidas en nuestro laboratorio por cultivo de células de melanoma de dos pacientes. Las líneas AC y BB expresan antígenos de la serie MAGE. Las células diana se marcaron con ³H-timidina.

El análisis del fenotipo de los monocitos se realizó por citometría de flujo, empleando anticuerpos monoclonales procedentes de Becton-Dickinson (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems,

Erembodegen, Bélgica), en su forma conjugada con isotiocianato de fluoresceína o con Rodamina para los análisis de doble marcaje. Cada análisis se acompañó de su isotipo control apropiado.

El aislamiento de los granos de secreción se realizó siguiendo el método descrito por Podack¹². La actividad DNasa, del extracto proteico de los granos, se valoró por la capacidad para degradar DNA genómico; se usó DNA genómico libre de proteínas aislado de sangre venosa humana por las técnicas convencionales.

La determinación cuantitativa de IL-1 α , IL-6, TNF α , IL-2 e INF γ en los sobrenadantes del cultivo de los PBMC se realizó mediante "kits" comerciales específicos (QUANTI-KINE™, R&D Systems).

La detección inmunocitoquímica de la iNOS se ha realizado usando un anticuerpo policlonal obtenido de conejo contra un extracto de NOS de macrófagos extraídos de pulmón de rata y activados con lipopolisacárido, como se ha descrito en trabajos previos¹³.

RESULTADOS

Se han sintetizado péptidos de 15 aminoácidos, 14 de los cuales corresponden con las secuencias de los antígenos de rechazo tumoral de melanomas tirosinasa, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 y MAGE 12. Una valina se ha introducido en el extremo C-terminal por conveniencia en el proceso de la síntesis química de los péptidos. La tabla 1 recoge las secuencias de los 13 péptidos sintetizados y se indica la proteína

Tabla 1. Secuencias de los péptidos derivados de antígenos de rechazo tumoral, objeto de este trabajo.

| Péptido | Secuencia | Proteína | Posición |
|---------|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | EKEGLPQLVSEPI | Tyrosinase | 503-516 |
| 2 | TSSSSPLVLGTFEE | MAGE 1 | 31-45 |
| 3 | GASAFPTTINFTRQ | MAGE 1 | 59-73 |
| 4 | YRAREPVTKAEMLE | MAGE 1 y 2 | 116-130,123-131 |
| 5 | EGGHAPEEEIWEEL | MAGE 1 | 204-218 |
| 6 | SQHCKPEEGLEARG | MAGE 2, 3 y 6 | 6-20 |
| 7 | EGDCAPEEKIWEEL | MAGE 2,3,6 y 12 | 211-225 |
| 8 | EFLWGPRALIETSY | MAGE 2 y 6 | 269-283 |
| 9 | SVFAHPRKLLTGRT | MAGE 12 | 236-247 |
| 10 | SLHCKPEEALEAQQ | MAGE 1 | 6-20 |
| 11 | GASSLPPTMNYPLW | MAGE 3 y 6 | 66-80 |
| 12 | TSIWIPIEEESLPP | none | |
| 13 | QGPKVPLSQWEPPI | none | |

de la que proceden. Como puede observarse todos ellos contienen una prolina en posición 6. Algunos de estos péptidos contienen en posiciones 2 y 11 los aminoácidos que completan el motivo "2-6-11" característico de péptidos inmunopotenciadores y que se señalan en negro (aminoácidos Val, Ile, Leu, Gly, Ala o Lys en posición 2 y el aminoácido Glu, Asp, o Lys ocupa la posición 11). Se han sintetizado también otros péptidos con secuencias que suponen variaciones sobre ese motivo estructural. Los péptidos 12 y 13 no tienen secuencias presentes en proteínas naturales y han sido usados como controles positivos para discriminar la influencia de las variaciones de la secuencia sobre las propiedades de los péptidos.

Cuando se añade uno de los péptidos al medio de incubación de los PBMC se produce un aumento de la liberación de las monoquinas L-1 α , IL-6 y TNF α (Fig. 1A, B y C); en el caso de los péptidos 4, 5 y 7, que no poseen completo el motivo estructural común, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de los valores de liberación de ninguna de las tres citoquinas cuando están presentes respecto a los valores obtenidos en ausencia de estos péptidos.

Los valores de las citoquinas IL-2 e INF γ , liberadas a los mismos sobrenadantes de las PBMC, se muestran también en la figura 1. Los requerimientos estructurales son mayores para que los péptidos induzcan la liberación de estas citoquinas, por parte de las células Th1, que para inducir la liberación de monoquinas; así sólo los péptidos 1, 12 y 13 incrementan la liberación de IL-2 (Fig. 2D) a valores que dan diferencias estadísticamente significativas respecto a los obtenidos cuando la incubación de los PBMC se realiza en ausencia de péptidos; de forma similar sólo los péptidos 8 y 12 inducen una liberación de INF γ (Fig. 1E) estadísticamente significativa respecto a los controles.

Los monocitos, recuperados como células adherentes tras la incubación de PBMC en presencia de péptidos activos, que como el 8 y el 12 inducen liberación de INF γ , fueron inmunorreactivos para la iNOS; se pudo observar (datos no mostrados) una diferencia clara en el número de

monocitos que expresan esta enzima. El número de células iNOS $^{+}$ es mucho mayor cuando la incubación se realiza en presencia de los péptidos respecto a los encontrados cuando la incubación es realizada en su ausencia.

Se ha determinado la actividad DNasa, medida como capacidad de degradar DNA, en el extracto de gránulos correspondientes a monocitos recuperados de la incubación de PBMC en presencia o ausencia de péptidos. La figura 2 muestra que los péptidos activos 1 y 12 inducen un aumento de la actividad DNasa de los extractos de gránulos de los monocitos respecto a la actividad encontrada en los monocitos procedentes de las incubaciones realizadas en ausencia de péptidos.

El análisis por citometría de flujo de la coexpresión del marcador CD14 y CD16 o HLA-DR mostró que los péptidos inducen un aumento del número de monocitos con fenotipo de células diferenciadas y activadas (Tabla 2); la proporción de monocitos CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ se correlaciona positivamente con la actividad DNasa asociada a los gránulos de secreción ($r = 0,70$) tras 4 días de incubación de los PBMC; la iNOS se expresó a las 24 horas cuando la expresión de HLA-DR se había incrementado y era abundante la subpoblación de monocitos con un fenotipo CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ DR $^{++}$.

Tabla 2. Porcentaje de monocitos CD14 $^{++/+}$ y CD14 $^{+}$, CD16 $^{+}$.

| | CD14 $^{++/+}$ (%PBMC) | CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ (%CD14 $^{+}$) |
|------------------------|---------------------------|--|
| Controles | 11 \pm 2 | 10 \pm 2 |
| Incubadas con péptidos | 13 \pm 2 | 34 \pm 4 |

Los datos representan la media \pm SD.

Por último, la determinación de la actividad lítica de los monocitos frente a las líneas celulares HT-29 y AC y BB mostró que el péptido 2 induce una citotoxicidad dependiente del monocito frente a las tres líneas, el péptido 11 frente a la AC y BB, mientras que el péptido 12 no es capaz de inducir esta actividad respecto a ninguna de las líneas celulares.

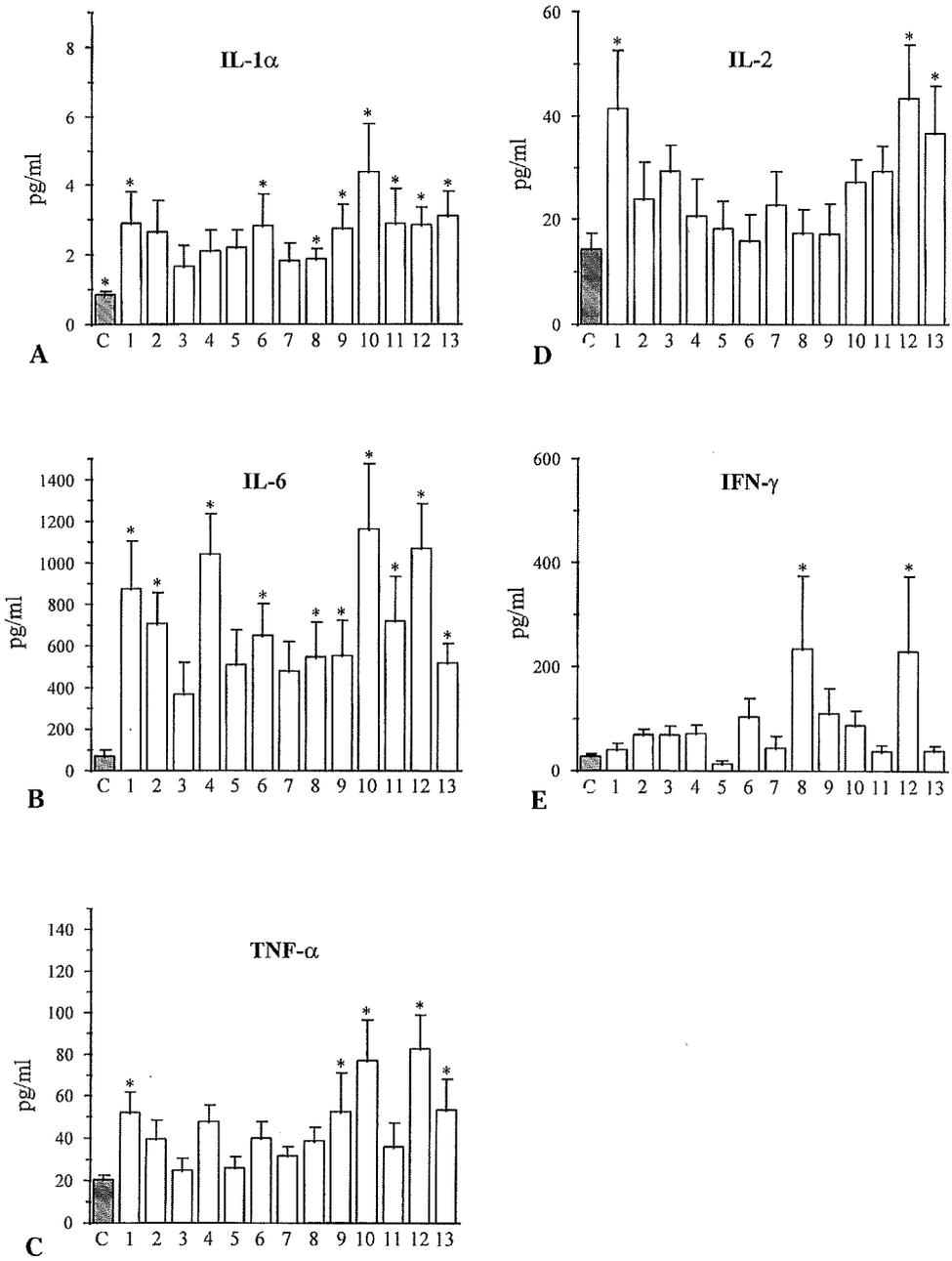


Figura 1. Liberación de citoquinas por PBMC inducida por péptidos derivados de antígenos tumorales. La concentración de péptido es 30 μ g/ 10^6 células. Los valores representan la media \pm SD de los duplicados de 5 experimentos independientes usando células obtenidas de diferentes donantes. (*) Las diferencias entre las células tratadas con péptidos o sin péptidos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En los últimos años ha avanzado notablemente el conocimiento de los requerimientos estructurales necesarios para que péptidos pequeños puedan interactuar con las moléculas de HLA-II. En el presente trabajo mostramos que péptidos cortos, con un motivo estructural común, el "2-6-11" o variaciones del mismo, y con secuencias presentes en antígenos asociados a tumores, como son la tirosinasa y las proteínas codificadas por los genes de la familia del antígeno del melanoma MAGE (Tabla 1), presentan una capacidad inmunopotenciadora manifestada por activación del monocito y de las células Th1, cuando son presentados en el contexto de HLA-DR. La estimulación inducida por estos péptidos en los monocitos permite la liberación de diferentes monoquinas, de conocido efecto antitumoral inespecífico. La IL-1 α tiene efecto citostático y citotóxico directo sobre líneas tumorales *in vitro*¹⁴. El TNF α tiene efecto citotóxico directo sobre ciertas líneas tumorales mediante un mecanismo en el que intervienen radicales libres y enzimas lisosomales¹⁵ y forma parte del mecanismo citolítico que desarrollan los monocitos y células NK al entrar en contacto con células tumorales¹⁶. La IL-6 facilita la generación y función de los linfocitos T citotóxicos (CTL) a través de la inducción de perforina y serín-esterasas que participan en la lisis celular¹⁷.

A su vez los monocitos pueden presentar algunos de estos péptidos a linfocitos Th e inducir una respuesta Th1 con liberación de citoquinas por estas células. La IL-2 tiene poder mitogénico y favorece el desarrollo de CTL que son antígeno-específicos¹⁸. En monocitos induce la secreción de IL-1, actividad citotóxica y aumenta la fagocitosis; mientras que en las células NK induce la producción de IFN- γ , su proliferación y aumenta su actividad citotóxica¹⁹. La IL-2 ha sido utilizada en varios ensayos clínicos, donde ha demostrado su efecto antitumoral frente a melanoma cuando se administra en compañía de linfocitos infiltrantes de tumor expandidos *in vitro*²⁰; sin embargo, la administración sistémica de IL-2 tiene efectos secundarios adversos que podrían ser reducidos si se diera una liberación de IL-2 en el mismo lugar del

tumor. El IFN γ aumenta la actividad antitumoral de los monocitos/macrófagos mediante la inducción de citoquinas mediadoras de la inflamación (IL-1 α , TNF- α , IL-6) y la producción de NO²¹; y activa directamente las células NK y las CTL aumentando la respuesta inmune citotóxica¹⁹. Por tanto, los péptidos derivados de los antígenos de rechazo tumoral de melanomas parecen tener un potencial efecto antitumoral indirecto al inducir a los monocitos/macrófagos a secretar interleuquinas, y sus propiedades dan cuenta del carácter de antígeno de rechazo de estas moléculas.

Los datos de este trabajo respecto al cambio del fenotipo de los monocitos hacia células con capacidad diferenciadas (Tabla 2) sugieren que los péptidos son capaces además de desarrollar e incrementar la actividad citotóxica y citostática de los monocitos que podrían ser más específicas. Estas células, activadas por IFN γ y TNF α , en contacto directo con las células tumorales pueden lisarlas a través de un mecanismo que no requiere reconocimiento específico de la molécula HLA¹¹. Como hemos puesto de manifiesto, células en cultivo procedentes de melanomas, con diferentes fenotipos que incluyen la expresión de los antígenos de la serie MAGE, son diana de monocitos citotóxicos activadas por efecto de los péptidos inmunomoduladores. El incremento de la actividad DNasa inducida por los péptidos, así como la producción de NO debida a la inducción por los péptidos de la expresión de la iNOS, formarían parte de los mecanismos líticos antitumorales de los monocitos/macrófagos. De hecho hay evidencias que indican que la metástasis puede ser eliminada en algunos tumores experimentales mediante la activación de macrófagos *in vivo* o la transferencia de macrófagos activados *in vitro*²², aunque aún se desconoce la importancia de su efecto citotóxico en la inmunoterapia. La localización de la DNasa en gránulos de secreción sugiere su posible implicación en los procesos citotóxicos mediados por la liberación de los agentes líticos del monocito hacia la célula diana. Por otra parte, el fenotipo de la subpoblación con la que hemos encontrado asociada dicha enzima, la subpoblación

1 2 3 4 5

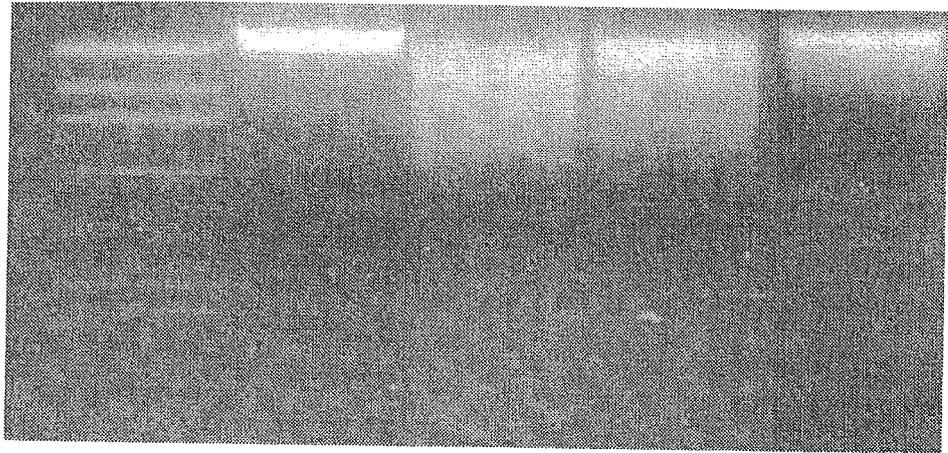


Figura 2. Electroforesis en gel que refleja la actividad DNasa de gránulos de monocitos recuperados por adherencia a partir de la población de células linfomononucleares incubadas en presencia del péptido 1 (calle 3) ó 12 (calle 4) o recuperados de la población celular incubada en ausencia de péptido (calle 5). La calle 1 corresponde a los marcadores de tamaño de DNA y la calle 2 a un DNA incubado sin extracto de proteínas con actividad DNasa. La electroforesis es representativa de 5 diferentes experimentos.

CD14⁺CD16⁺, corresponde con el descrito para monocitos citotóxicos²³.

En resumen, los datos presentados permiten sugerir que estos péptidos, derivados de antígenos de rechazo tumoral, tienen un potencial terapéutico antitumoral para el tratamiento de tumores sólidos; es posible el uso de estos compuestos para la expansión y activación, en cultivo, de la población de células linfomononucleares de sangre periférica convirtiéndose de esta forma, tanto por sus efectos inespecíficos como por los posibles específicos citotóxicos, en reactivos para estrategias de inmunización frente al cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

1. VAN DER BRUGGEN P, TRAVERSARI C, CHOMEZ P, LURQUIN C, DE PLAEN E, VAN DEN EYNDE B *et al*. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647.
2. BOON T, CEROTTINI JC, VAN DEN EYNDE B, VAN DER BRUGGEN P, VAN PEL A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 337-365.
3. KANG X, KAWAKAMI Y, EL-GAMIL M, WANG R, SAKAGUCHI K, YANNELLI JR *et al*. Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 1995; 155: 1343-1348.
4. ZIEGLER-HEITBROCK H W. The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol* 1989; 49:1-12.
5. LÓPEZ-MORATALLA N, LÓPEZ-ZABALZA MJ, SUBIRÁ ML, BORRÁS-CUESTA F, PÉREZ-MEDIAVILLA LA, SANTIAGO E. Immunomodulation induced by synthetic peptides derived from *Staphylococcus aureus* protein A. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1221: 153-158.
6. LÓPEZ-MORATALLA N, CALONGE MM, LÓPEZ-ZABALZA MJ, PÉREZ-MEDIAVILLA LA, SUBIRÁ ML, SANTIAGO E. Activation of human lymphomononuclear cells by peptides derived from extracellular matrix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1265: 181-188.
7. LÓPEZ-MORATALLA N, RUÍZ E, LÓPEZ-ZABALZA MJ, SANTIAGO E. A common structural motif in immunopotentiating peptides with sequences present in human autoantigens. Elicitation of a response mediated by

- monocytes and Th1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1317: 183-191.
8. LÓPEZ-MORATALLA N, MIGLIACIO M, LÓPEZ-ZABALZA MJ, PÉREZ-MEDIAVILLA LA, SANTIAGO E. Activation of human T Helper 1 and DNAase expression in CD4+ induced by short immunomodulating peptides. *Biochem Biophys Res Com* 1994; 205: 2008-2012.
 9. MERRIFIELD RB. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963; 85: 2149-2155.
 10. BOYUN A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Can J Clin Lab Invest* 1968, 21 (97 suppl).
 11. MELTZER MS. Macrophage activation-quantitation of cytotoxicity by (3H) thymidine release. En: Herscowitz HB, Holden HT, Belanti JA, Ghaffer A, editores. *Manual of Macrophage Methodology*. Marcel Dekker Inc., New York, 1981: 329-336.
 12. PODACK ER, YOUNG JD, COHN ZA. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T cell granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8629-8633.
 13. PÉREZ-MEDIAVILLA LA, LÓPEZ-ZABALZA MJ, CALONGE M, MONTUENGA L, LÓPEZ-MORATALLA N, SANTIAGO E. Inducible nitric oxide synthase in human lymphomononuclear cells activated by synthetic peptides derived from extracellular matrix proteins. *FEBS Letters* 1995; 357: 121-124.
 14. ONOZAKI K, MATSUSHIMA K, AGGARWAL BB, OPPENHEIM JJ. Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol* 1985; 135: 3962-3968.
 15. YAMAUCHI N, KURIYAMA H, WATANABE N, NEDA H, MAEDA M, NIITSU Y. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res* 1989; 49: 1671-1675.
 16. WRIGHT SC, BONAVIDA D. Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. VII. Functional comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; 138: 1791-1798.
 17. LIU CC, HOAG SV, KWON BS, YOUNG JD. Induction of perforing and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocytes clone. *J Immunol* 1995; 13: 251-276.
 18. SCHWARTZ RH. Coestimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin production and immunotherapy. *Cell* 1992; 71: 1065-1068.
 19. TRINCHIERI G, PERUSSIA B. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 1985; 6: 131.
 20. ROSENBERG S, PACKARD B, AEBERSOLD P, SOLOMON D, TOPALIAN S, LOTZE M et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Eng J Med* 1988; 319: 1676-1680.
 21. LIEW FY, MILLOTT S, PARKINSON C, PALMER RM, MONCADA S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginina. *J Immunol* 1990; 144: 4794-4797
 22. WHITWORTH PW, PAK CC, ESGRO J, KLEINERMAN ES, FIDLER IJ. Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 4: 319-351.
 23. PASSLICK B, FLIEGER D, ZIEGLER-HEITBROCK HWL. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74: 2527-2534.