

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 590**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2009 E 09782520 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2321340**

54 Título: **Nuevo péptido antígeno del melanoma y usos del mismo**

30 Prioridad:

02.09.2008 EP 08305517

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.10.2014

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

UNIVERSITE DE NANTES I (33.3%) y

CHU NANTES (33.3%)

72 Inventor/es:

LABARRIERE, NATHALIE;

MOREAU-AUBRY, AGNÈS y

GODET, YANN

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 514 590 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo péptido antígeno del melanoma y usos del mismo

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a péptidos antígenos de melanoma llamados MELOE y su uso para prevenir, tratar y diagnosticar el melanoma.

10 **Estado de la técnica**

Los melanomas son tumores agresivos, frecuentemente metastásicos derivados de melanocitos o células névicas relacionadas con melanocitos. Los melanomas representan aproximadamente el tres por ciento de todos los cánceres cutáneos e incluso cuando está localizado aparentemente en la piel, hasta el 30 % de los pacientes desarrollan metástasis sistémica. Las modalidades clínicas de tratamiento del melanoma incluyen cirugía, radiación y quimioterapia. Después ha surgido la inmunoterapia y la terapia génica como métodos prometedores para tratar el melanoma. Los resultados de Rosenberg han mostrado que la transferencia adoptiva a pacientes con melanoma metastásico de linfocitos que se infiltran en tumores (TIL) que reconocen antígenos de cáncer, son capaces de mediar en la regresión de cáncer metastásico en el 35 al 40 % de los pacientes con melanoma.

En los últimos veinte años, se han identificado muchos antígenos de melanoma humano reconocidos por linfocitos T (documento WO 96/21734) usando diversos métodos tales como clonación de ADNc, purificación de péptido unido a MHC o inducción de linfocitos T contra péptidos o proteínas candidatos. Estos antígenos se han clasificado en varios grupos: antígenos de diferenciación melanocítica (tales como Melan-A/MART-1) (1), antígenos de línea germinal de cáncer, compartidos por varios tumores y células de línea germinal masculina (tales como antígenos MAGE) (2, 3), antígenos mutados generados por alteraciones genéticas (tales como CDK4) (4), antígenos sobreexpresados en diversos tipos tumorales (tales como PRAME) (5), y antígenos expresados de forma aberrante en tumores (tales como NA17-A y NA88-A) (6, 7). Sin embargo, a pesar de su alto número, la inmunogenicidad de estos antígenos no se ha dilucidado aún, a excepción de Melan-A/MART-1. De hecho, la inmunogenicidad del antígeno Melan-A en melanoma se ha sugerido fuertemente por el análisis de varios protocolos de inmunoterapia activa (8,9) y pasiva (10-15) que se dirigen a este antígeno.

La identificación de antígenos de melanoma adicionales con un potencial inmunogénico documentado sigue siendo un asunto importante para abordar para la inmunoterapia de cáncer, especialmente para el melanoma.

35 **Objeto de la invención**

Un objeto de la invención es un péptido antígeno de melanoma que es una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos de longitud, que comprende el motivo de aminoácidos:

- 40 - TX₂NDECWPX₉ (SEC ID N°: 2)
en el que X₂ es leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X₉ es alanina, valina o leucina,
o
- 45 - RX₂PPKPPLX₉ (SEC ID N°: 3)
en el que X₂ es cisteína, leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X₉ es alanina, valina o leucina.

Otro objeto de la invención es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido antígeno de melanoma de la invención.

50 Otro objeto de la invención es una célula hospedadora que comprende dicho vector de expresión.

Otro objeto de la invención es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une con MELOE-1 o MELOE-2.

55 Otro objeto de la invención es un multímero de MHC/péptido que comprenden un péptido antígeno de melanoma de la invención.

Otro objeto de la invención es una composición inmunizante que comprende

- 60 (a) al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención,
- (b) al menos un vector de expresión de la invención,
- (c) al menos una célula hospedadora de la invención,
- (d) al menos un anticuerpo de la invención o
- (e) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención.

65 Otro objeto de la invención es un linfocito T que reconoce específicamente un péptido antígeno de melanoma de la

invención.

Otro objeto de la invención es una composición para terapia adoptiva que comprende dichos linfocitos T.

5 Otro objeto de la invención es un método para producir dichos linfocitos T que comprenden las etapas de:

- (a) estimular las PBMC o los TIL obtenidos de un sujeto con al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención,
 (b) enriquecer la población de linfocitos T específicos para el péptido o los péptidos antígenos de melanoma usados en (a),
 10 (c) opcionalmente clonar dicha población de linfocitos T específicos para el péptido o los péptidos antígenos de melanoma usados en (a).

15 Otro objeto de la invención es dicha composición inmunizante para prevenir o tratar el melanoma en un sujeto que lo necesite.

Otro objeto de la invención es un método *in vitro* para diagnosticar un melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende detectar la expresión de al menos uno de:

- 20 - ARNm de MELOE (SEC ID N°: 1),
 - polipéptido MELOE-1 (SEC ID N°: 4),
 - polipéptido MELOE-2 (SEC ID N°: 5),

en una muestra obtenida de dicho sujeto.

25 Otro objeto de la invención es un método para controlar un melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende determinar la frecuencia de linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antígeno de melanoma de la invención.

30 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

35 Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene menos de 50 aminoácidos. Como se usa en el presente documento, el término "péptido" abarca secuencias de aminoácidos que tienen menos de 50 aminoácidos, menos de 40 aminoácidos, menos de 30 aminoácidos, menos de 25 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos, menos de 15 aminoácidos o menos de 10 aminoácidos.

40 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína capaz de unirse específicamente con un antígeno, típicamente y preferentemente uniéndose con un epítipo o determinante antigénico o dicho antígeno. El término "anticuerpo" también incluye proteínas recombinantes que comprenden los dominios de unión, así como variantes y fragmentos de anticuerpos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, dsFv, scFv, sc(Fv)₂, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

45 "Variantes conservativas para función" como se usa en el presente documento se refiere a en las que un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima se ha cambiado (insertado, suprimido o sustituido) sin alterar la conformación y función general del polipéptido. Dichas variantes incluyen proteínas que tienen alteraciones de aminoácidos tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones. Una "delección" se refiere a la ausencia de uno o más aminoácidos en la proteína. Una "inserción" se refiere a la adición de uno o más aminoácidos en la proteína. Una "sustitución" se refiere al reemplazo de uno o más aminoácidos por otro resto de aminoácido en la proteína. Típicamente, se reemplaza un aminoácido dado por un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlaces de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el porcentaje de similitud de secuencia de proteínas o aminoácidos entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % como se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento tal como por el método de grupos, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservativa para función" también incluye un polipéptido que tiene al menos 60 % de identidad de aminoácidos como se determina por los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 85 %, aún preferentemente al menos 90 %, y aún más preferentemente al menos 95 %, y que tiene propiedades o funciones iguales o sustancialmente similares a la proteína nativa o parental con la que se compara. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 80 %, preferentemente más del 85 %, preferentemente más del 90 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90 %, preferentemente más del 95 % son similares (funcionalmente idénticos) sobre la longitud completa de la secuencia más corta. Preferentemente, las secuencias similares y homólogas se identifican por alineamiento usando, por ejemplo, el programa de apilación GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for

the GCG Package, Versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencia tales como BLAST, FASTA, etc.

5 La expresión “Complejo Mayor de Histocompatibilidad” (MHC) es una designación genérica que se pretende que abarque los sistemas de antígenos de histocompatibilidad descritos en diferentes especies incluyendo los antígenos de leucocitos humanos (HLA).

10 El término “melanoma”, como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, melanomas, melanomas metastásicos, melanomas derivados de melanocitos o células névicas relacionadas con melanocitos, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanosarcomas, melanoma *in situ*, melanoma de proliferación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral, melanoma ocular, melanoma invasivo o síndrome de lunar atípico familiar y melanoma (FAM-M). Dichos melanomas en mamíferos pueden estar provocados por anomalías cromosómicas, crecimiento degenerativo y trastornos del desarrollo, agentes mitogénicos, radiación ultravioleta (UV), infecciones virales, expresión tisular inapropiada de un gen, alteraciones en la expresión de un gen
15 o agentes carcinogénicos.

20 El término “tratar” un trastorno o afección se refiere a invertir, aliviar o inhibir el proceso de uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. El término “prevenir” un trastorno o afección se refiere a prevenir uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

25 El término “diagnosticar” como se usa en el presente documento se refiere al proceso de identificar una afección médica o enfermedad. Como se usa en el presente documento, el término “marcador” o “biomarcador” se refiere a una molécula usada como una diana para analizar las muestras biológicas del sujeto.

30 Una “muestra biológica” como se usa en el presente documento se refiere a una diversidad de tipos de muestra obtenidos de un sujeto y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o de control. Las muestras biológicas incluyen pero sin limitación sangre, suero, plasma, líquido ascítico, efusiones, muestras de tejido sólido tales como muestra de ensayo de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos, y la descendencia de los mismos, muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen células obtenidas de una muestra tisular recogida de un sujeto que se sospecha que tiene un melanoma.

35 Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

40 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en el presente documento se entiende para una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente eficaz del agente activo” para un sujeto es una cantidad del agente activo que induce, alivia o provoca una mejora en los síntomas patológicos, progresión de enfermedad o afecciones físicas asociadas con la enfermedad que afecta al sujeto.

45 El término “adyuvante” como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una mezcla que puede ser no inmunogénico cuando se administra en el hospedador solo, pero que aumenta la respuesta inmunitaria del hospedador a un antígeno cuando se administra conjuntamente con ese antígeno.

La invención

50 Para identificar nuevos antígenos de melanoma, los inventores estudiaron poblaciones de TIL que se habían infundido a pacientes de melanoma en una situación con adyuvante, después de escisión de ganglio linfático invadido, entre 1994 y 2002, y que aún no han tenido recaída (16). Los autores han mostrado previamente una correlación entre la infusión de TIL específicos de melanoma y prevención de la recaída (17). Más recientemente, han mostrado una correlación entre la infusión de TIL específicos de Melan-A/MART-1 y prevención de la recaída de pacientes tratados con HLA-A2 (14). No obstante, en varias poblaciones de TIL infundidos a pacientes sin recaída, una fracción significativa de TIL específicos de tumor siguen siendo de especificidad desconocida. Para caracterizar
55 completamente estos TIL específicos de tumor y para buscar un nuevo o nuevos antígenos tumorales implicados en la prevención de recaída, los inventores usaron una población de TIL infundida a un paciente M170 en 1998, que aún hoy no ha tenido recaída (18). Esta población de TIL HLA-A2 contenía una fracción significativa de TIL reactivos para melanoma, entre los que estaban presentes linfocitos específicos de Melan-A/A2 y linfocitos de especificidad desconocida.

60 El estudio de estos linfocitos de especificidad desconocida condujo a los inventores a identificar una nueva secuencia de ARNm (SEC ID N°: 1) llamada *meloe* (sobrexpresada en melanoma) que se sobreexpresa en melanoma, y que codifica polipéptidos reconocidos por TIL autólogos en el contexto de HLA-A2.

65 La invención proporciona una secuencia de ácido nucleico SEC ID N°: 1, que codifica dos péptidos antígenos de melanoma nuevos reconocidos por linfocitos T: MELOE-1 y MELOE-2.

MELOE-1 está codificado por la fase abierta de lectura 1230-1370 pb de SEC ID N°: 1 y MELOE-2 está codificado por la fase abierta de lectura 285-404 pb de SEC ID N°: 1.

5 Los inventores identificaron dos motivos peptídicos específicos: TLNDECWPA en MELOE-1 y RCPPKPPLA en MELOE-2, siendo dichos motivos capaces de unirse con la molécula HLA-A2 e inducir una respuesta de linfocitos T.

10 Con respecto a los motivos peptídicos capaces de unirse con HLA-A2, se conoce en la técnica que el 2º aminoácido del extremo N terminal puede ser leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y el aminoácido en el extremo C terminal puede ser leucina o valina (39,40).

Por lo tanto, un objeto de la invención es un péptido antígeno de melanoma que comprende el motivo de aminoácidos:

15 (a) TX₂NDECWPX₉ (SEC ID N°: 2)
en el que X₂ es leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X₉ es alanina, valina o leucina,

o
20 (b) RX₂PPKPPLX₉ (SEC ID N°: 3)
en el que X₂ es cisteína, leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X₉ es alanina, valina o leucina.

En una realización de la invención, por "péptido antígeno de melanoma" se entiende un péptido capaz de unirse con una molécula HLA y provocar una respuesta celular o humoral en un sujeto.

25 En una primera realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma puede comprender un motivo específico de modo que el polipéptido se una con una molécula de HLA e induzca una respuesta de CTL.

En una segunda realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma puede comprender un motivo específico de modo que el polipéptido se una con una molécula de HLA e induzca una respuesta de linfocitos T auxiliares.

30 En una realización de la invención, dichos péptidos antígenos de melanomas como se han descrito anteriormente en el presente documento están restringidos por HLA-A2.

35 Dicho péptido antígeno de melanoma es una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha definido anteriormente en el presente documento.

40 En otra realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma es una secuencia de aminoácidos de menos de 45 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha definido anteriormente en el presente documento.

45 En otra realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma es una secuencia de aminoácidos de menos de 40 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En otra realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma es una secuencia de aminoácidos de menos de 30 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha definido anteriormente en el presente documento.

50 En otra realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma es una secuencia de aminoácidos de menos de 20 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha definido anteriormente en el presente documento.

55 En otra realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma es una secuencia de aminoácidos de menos de 15 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha definido anteriormente en el presente documento.

60 En otra realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma es una secuencia de aminoácidos de 9, 10 u 11 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha definido anteriormente en el presente documento.

65 En una realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma se selecciona del grupo que consiste en MELOE-1 que tiene la secuencia SEC ID N°: 4 y MELOE-2 que tiene la secuencia SEC ID N°: 5.
SEC ID N°: 4 MSCVGYDEATSREQFLPSEGAACPPWHPSEISSTLNDECWPASL
SEC ID N°: 5 MSNAGGAVARTATAFCALVSPTQPRCPPKPPLAALCQ

ES 2 514 590 T3

En otra realización de la invención, dicho péptido antígeno de melanoma se selecciona del grupo que consiste en péptidos MELOE-1 que tienen la secuencia SEC ID N°: 6 a SEC ID N°: 20 y péptidos MELOE-2 que tienen la secuencia SEC ID N°: 21 a SEC ID N°: 38.

MELOE-1 SEC ID N° 6	X ₂ = L	X ₉ = A	TLNDECWPA
MELOE-1 SEC ID N° 7	X ₂ = M	X ₉ = A	TMNDECWPA
MELOE-1 SEC ID N° 8	X ₂ = V	X ₉ = A	TVNDECWPA
MELOE-1 SEC ID N° 9	X ₂ = I	X ₉ = A	TINDECWPA
MELOE-1 SEC ID N° 10	X ₂ = Q	X ₉ = A	TQNDECWPA
MELOE-1 SEC ID N° 11	X ₂ = L	X ₉ = V	TLNDECWPV
MELOE-1 SEC ID N° 12	X ₂ = M	X ₉ = V	TMNDECWPV
MELOE-1 SEC ID N° 13	X ₂ = V	X ₉ = V	TVNDECWPV
MELOE-1 SEC ID N° 14	X ₂ = I	X ₉ = V	TINDECWPV
MELOE-1 SEC ID N° 15	X ₂ = Q	X ₉ = V	TQNDECWPV
MELOE-1 SEC ID N° 16	X ₂ = L	X ₉ = L	TLNDECWPL
MELOE-1 SEC ID N° 17	X ₂ = M	X ₉ = L	TMNDECWPL
MELOE-1 SEC ID N° 18	X ₂ = V	X ₉ = L	TVNDECWPL
MELOE-1 SEC ID N° 19	X ₂ = I	X ₉ = L	TINDECWPL
MELOE-1 SEC ID N° 20	X ₂ = Q	X ₉ = L	TQNDECWPL
MELOE-2 SEC ID N° 21	X ₂ = C	X ₉ = A	RCPPKPPLA
MELOE-2 SEC ID N° 22	X ₂ = L	X ₉ = A	RLPPKPPLA
MELOE-2 SEC ID N° 23	X ₂ = M	X ₉ = A	RMPPKPPLA
MELOE-2 SEC ID N° 24	X ₂ = V	X ₉ = A	RVPPKPPLA
MELOE-2 SEC ID N° 25	X ₂ = I	X ₉ = A	RIPPKPPLA
MELOE-2 SEC ID N° 26	X ₂ = Q	X ₉ = A	RQPPKPPLA
MELOE-2 SEC ID N° 27	X ₂ = C	X ₉ = V	RCPPKPPLV
MELOE-2 SEC ID N° 28	X ₂ = L	X ₉ = V	RLPPKPPLV
MELOE-2 SEC ID N° 29	X ₂ = M	X ₉ = V	RMPPKPPLV
MELOE-2 SEC ID N° 30	X ₂ = V	X ₉ = V	RVPPKPPLV
MELOE-2 SEC ID N° 31	X ₂ = I	X ₉ = V	RIPPKPPLV
MELOE-2 SEC ID N° 32	X ₂ = Q	X ₉ = V	RQPPKPPLV
MELOE-2 SEC ID N° 33	X ₂ = C	X ₉ = L	RCPPKPPLL
MELOE-2 SEC ID N° 34	X ₂ = L	X ₉ = L	RLPPKPPLL
MELOE-2 SEC ID N° 35	X ₂ = M	X ₉ = L	RMPPKPPLL
MELOE-2 SEC ID N° 36	X ₂ = V	X ₉ = L	RVPPKPPLL
MELOE-2 SEC ID N° 37	X ₂ = I	X ₉ = L	RIPPKPPLL
MELOE-2 SEC ID N° 38	X ₂ = Q	X ₉ = L	RQPPKPPLL

5

La invención también abarca péptidos que son variantes conservativas para la función de péptidos antígenos de melanoma que comprenden SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Típicamente, la invención abarca péptidos sustancialmente idénticos a péptidos antígenos de melanoma que comprenden SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 en los que uno o más restos se han sustituido de forma conservativa con un resto funcionalmente similar y que presentan los aspectos funcionales de los péptidos antígenos de melanoma que comprenden SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 como se ha descrito anteriormente en el presente documento, es decir que aún son capaces de unirse con una molécula de HLA sustancialmente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos dada. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un resto polar (hidrófilo) por otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina, la sustitución de un resto básico tal como lisina, arginina o histidina por otro, o la sustitución de un resto ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico u otro.

La expresión "sustitución conservativa" también incluye el uso de un resto químicamente derivatizado en lugar de un resto no derivatizado. "Derivado químico" se refiere a un péptido objeto que tiene uno o más restos químicamente derivatizados por la reacción de un grupo lateral funcional. Los ejemplos de dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, las moléculas en las que los grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoilo, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, metil y etil ésteres u otros tipos de ésteres o hidracidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencilhistidina. Los derivados químicos también incluyen péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: 4-hidroxi prolina puede sustituir a prolina; 5-hidroxi lisina puede sustituir a lisina; 3-metilhistidina puede sustituir a histidina; homoserina puede sustituir a serina; y ornitina puede sustituir a lisina.

En una realización de la invención, el péptido antígeno de melanoma consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID N°: 6 a 38 o una variante de la misma.

De acuerdo con la invención, "que consiste esencialmente en" significará que un péptido de acuerdo con la presente invención, además de la secuencia de acuerdo con cualquiera de SEC ID N° 6 a SEC ID N° 38 o una variante de la misma, contiene tramos localizados N y/o C terminal adicionales de aminoácidos que no forman necesariamente parte del péptido que actúa como secuencia principal del péptido que comprende el motivo de unión y como un epítipo inmunogénico.

De acuerdo con la invención, los péptidos antígenos de melanoma de la invención pueden obtenerse sintetizando los péptidos de acuerdo con el método para síntesis peptídica conocido en la técnica.

Otro objeto de la invención es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En una realización de la invención, dicho vector de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la fase abierta de lectura 1230-1370 pb de SEC ID N°: 1.

En otra realización de la invención, dicho vector de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la fase abierta de lectura 285-404 pb de SEC ID N°: 1.

En otra realización de la invención, dicho vector de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la fase abierta de lectura 1230-1370 pb de SEC ID N°: 1 combinada con la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la fase abierta de lectura 285-404 pb de SEC ID N°: 1.

En otra realización de la invención, dicho vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 5.

En otra realización de la invención, dicho vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 6 a SEC ID N°: 38.

De acuerdo con la invención, los vectores de expresión adecuados para su uso en la invención pueden comprender al menos un elemento de control de la expresión unido operativamente con la secuencia de ácido nucleico. Los elementos de control de la expresión se insertan en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Los ejemplos de elementos de control de la expresión incluyen, pero sin limitación, sistema lac, regiones operadoras y promotoras del fago lambda, promotores de levadura y promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus, lentivirus o SV40. Los elementos operativos adicionales preferidos o requeridos incluyen, pero sin limitación, secuencia líder, codones de terminación, señales de poliadenilación y cualquier otra secuencia necesaria o preferida para la transcripción apropiada y posterior traducción de la secuencia de ácido nucleico en el sistema hospedador. Se entenderá por un experto en la materia que la combinación correcta de elementos de

control de la expresión requeridos o preferidos dependerá del sistema hospedador seleccionado. Se entenderá además que el vector de expresión contendrá elementos adicionales necesarios para la transferencia y posterior replicación del vector de expresión que contiene la secuencia de ácido nucleico en el sistema hospedador. Los ejemplos de dichos elementos incluyen, pero sin limitación, orígenes de replicación y marcadores seleccionables. Se entenderá además por un experto en la materia que dichos vectores se construyen fácilmente usando métodos convencionales o disponibles en el mercado.

Otro objeto de la invención es una célula hospedadora que comprende un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con la invención, son ejemplos de células hospedadoras que pueden usarse las células eucariotas, tales como células animales, vegetales, de insectos y de levadura y células procariotas, tales como *E. coli*. Los medios por los que el vector que porta el gen puede introducirse en las células incluyen, pero sin limitación, microinyección, electroporación, transducción o transfección usando DEAE-dextrano, lipofección, fosfato cálcico u otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

En una realización preferida, se usan vectores de expresión eucariotas que actúan en células eucariotas. Los ejemplos de dichos vectores incluyen, pero sin limitación, vectores virales tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes, virus vaccinia, poxvirus, poliovirus; lentivirus, vectores de expresión bacterianos, plásmidos, tales como pcDNA3 o los vectores de transferencia de baculovirus. Las líneas celulares eucariotas preferidas incluyen, pero sin limitación, células COS, células CHO, células HeLa, células NIH/3T3, células 293 (ATCC N° CRL1573), células T2, células dendríticas o monocitos.

En una realización de la invención, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une con MELOE-1 (SEC ID N°: 4).

En otra realización de la invención, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une con MELOE-2 (SEC ID N°: 5).

En una realización de la invención, dicho anticuerpo es monoclonal. En otra realización de la invención, dicho anticuerpo es policlonal.

Dichos anticuerpos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en "Antibodies: A laboratory manual", Lane H. D. *et al.* eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989 o Antibody Engineering: Methods and Protocols, 2003, Benny K. Lo.

Otro objeto de la invención es un multímero MHC/péptido que comprende un péptido antígeno de melanoma (SEC ID N°: 6 a 38) como se ha descrito anteriormente en el presente documento. De acuerdo con la invención, dicho multímero de MHC/péptido incluye, pero sin limitación, un dímero, trímero, tetrámero o pentámero de MHC/péptido.

En una realización de la invención, dicho multímero de MHC/péptido es un multímero de HLA-A2/péptido.

Se describen métodos para obtener tetrámeros de MHC/péptido en los documentos WO96/26962 y WO01/18053.

En una realización de la invención, dicho multímero de MHC/péptido puede usarse para visualizar poblaciones de linfocitos T que son específicas para el complejo HLA-A2/péptido antígeno de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En otra realización de la invención, dicho multímero de MHC/péptido puede usarse para la detección y/o el aislamiento por exploración (en citometría de flujo o por exploración inmunomagnética) de poblaciones de linfocitos T que son específicas para un complejo de HLA/péptido antígeno de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En otra realización de la invención, dicho multímero de HLA-A2/péptido puede usarse para la detección y/o el aislamiento por exploración (en citometría de flujo o por exploración inmunomagnética) de poblaciones de linfocitos T que son específicas para un complejo de HLA-A2/péptido antígeno de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Otro objeto de la invención son perlas recubiertas con multímeros de MHC/péptido como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Otro objeto de la invención es una composición inmunizante que comprende

- (a) al menos un péptido antígeno de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (b) al menos un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (c) al menos una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (d) al menos un anticuerpo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o
- (e) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un péptido antígeno de melanoma como se

ha descrito anteriormente en el presente documento.

En una realización, dicha composición inmunizante comprende el péptido antigénico de melanoma MELOE-1 que tiene la secuencia SEC ID N°: 4 o el péptido antigénico de melanoma MELOE-2 que tiene la secuencia SEC ID N°: 5.

En otra realización de la invención, dicha composición inmunizante comprende al menos un péptido antigénico de melanoma seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 6 a SEC ID N°: 38.

La administración profiláctica de la composición inmunizante de la invención debería actuar para prevenir o atenuar el melanoma en un mamífero. En una realización preferida los mamíferos, preferentemente seres humanos, con alto riesgo de melanoma se tratan de forma profiláctica con la composición inmunizante de la invención. Los ejemplos de dichos mamíferos incluyen, pero sin limitación, seres humanos con un historial familiar de melanoma, seres humanos con un historial de lunares atípicos, seres humanos con un historial de síndrome de FAM-M o seres humanos aquejados de melanoma previamente resecaado y por lo tanto en riesgo de reaparición.

Cuando se proporciona de forma terapéutica, la composición inmunizante de la invención se proporciona para potenciar la propia respuesta inmunitaria del paciente al antigénico de melanoma presente en el melanoma o melanoma metastásico.

En una realización de la invención, los péptidos de la invención pueden conjugarse con lipoproteína o administrarse en forma liposómica o con un adyuvante.

En una realización, dicha composición inmunizante es una composición farmacéutica.

En dicha realización, dicha composición inmunizante, para uso humano, comprende al menos un péptido antigénico de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento o al menos un anticuerpo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. El vehículo o los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no deletéreos para el receptor de la misma. Las composiciones inmunizantes pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica. Las composiciones inmunizantes adecuadas para administración intravenosa, intradérmica, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal comprenden convenientemente soluciones acuosas estériles del agente activo con soluciones que son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor. Dichas composiciones pueden prepararse convenientemente disolviendo principios activos sólidos en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles tales como cloruro sódico (por ejemplo 0,1-2,0 M), glicina y similares, y que tienen un pH tamponado compatible con condiciones fisiológicas para producir una solución acuosa, y haciendo dicha solución estéril. Estos pueden estar presentes en recipientes unitarios o de multidosis, por ejemplo, ampollas selladas o frascos.

Las composiciones inmunizantes de la invención pueden incorporar un estabilizador. Son estabilizadores ilustrativos el polietilenglicol, proteínas, sacáridos, aminoácidos, ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos que pueden usarse bien por sí solos o bien como mezclas. Estos estabilizadores se incorporan preferentemente en una cantidad de 0,11-10.000 partes en peso por partes en peso del agente activo. Si van a usarse dos o más estabilizadores, su cantidad total está preferentemente dentro del intervalo especificado anteriormente. Estos estabilizadores se usan en soluciones acuosas a la concentración y al pH apropiados. La presión osmótica específica de dichas soluciones acuosas está generalmente en el intervalo de 0,1-3,0 osmoles, preferentemente en el intervalo de 0,8-1,2. El pH de la solución acuosa se ajusta para que esté dentro del intervalo de 5,0-9,0, preferentemente dentro del intervalo de 6-8.

Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción. Pueden conseguirse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para formar complejo con o absorber los péptidos de la invención. El suministro controlado puede ejercitarse seleccionando macromoléculas apropiadas (por ejemplo poliéster, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, etilenvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o protamina sulfato) y la concentración de macromoléculas así como los métodos de incorporación para controlar la liberación. Otro método posible para controlar la duración de la acción por preparaciones de liberación controlada es incorporar los péptidos antígenos de melanoma de la invención a partículas de un material polimérico tales como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de etileno vinilacetato. Como alternativa, en lugar de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en sistemas de suministro farmacológico coloidales, por ejemplo, liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones.

Cuando se desean preparaciones orales, las composiciones pueden combinarse con vehículos típicos, tales como lactosa, sacarosa, almidón, talco, estearato de magnesio, celulosa cristalina, metil celulosa, carboximetil celulosa, glicerina, alginato sódico o goma arábiga entre otros.

5 La inmunización de un sujeto con la composición inmunizante de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, en presencia de adyuvantes convencionales. Los ejemplos de adyuvantes convencionales incluyen, pero sin limitación, sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptor de tipo Toll, saponinas, lípido A, alquil glucosaminida fosfato, adyuvante de Freund, hemocianina de lapa californiana (KLH), manano, BCG, alumbre, citocinas tales como IL-1, IL-2, factor estimulante de colonias de macrófagos, y factor de necrosis tumoral; y (6) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores tales como péptidos de muramilo o componentes de la pared celular bacteriana, toxinas, toxoides y ligandos de TLR.

10 La composición inmunizante puede administrarse por cualquier vía apropiada para producción de anticuerpos y/o activación de linfocitos T tales como intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea y similares. La composición inmunizante puede administrarse una vez o en intervalos periódicos hasta que se produce un título significativo de células inmunitarias anti MELOE-1 o MELOE-2 o anticuerpo anti MELOE-1 o MELOE-2. La presencia de células inmunitarias anti MELOE-1 o MELOE-2 puede evaluarse midiendo la frecuencia de los CTL (linfocitos T citotóxicos) precursores contra los péptidos antígenos de melanoma de la invención antes de y después de la
15 inmunización por marcaje de tetrámero específico (13) o por un ensayo de análisis de precursores de CTL (41). El anticuerpo puede detectarse en el suero usando un inmunoensayo.

20 También pueden usarse anticuerpos dirigidos a los antígenos de melanoma de la invención directamente como agentes antimelanoma. Para preparar anticuerpos, puede inmunizarse un animal hospedador usando la proteína MELOE-1 (SEC ID N^o: 4) o MELOE-2 (SEC ID N^o: 4) u otros péptidos antígenos de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento. El suero o plasma del hospedador se recoge después de un tiempo apropiado para proporcionar una composición que comprende anticuerpos reactivos para dichos péptidos antígenos de melanoma. La fracción de gama globulina o los anticuerpos IgG pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el uso
25 de sulfato de amonio saturado o DEAE Sephadex, u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los anticuerpos están sustancialmente sin muchos de los efectos secundarios adversos que pueden estar asociados con otros agentes antineoplásicos tales como quimioterapia.

30 La composición inmunizante de la invención que comprende anticuerpos como se ha descrito anteriormente en el presente documento puede hacerse aún más compatible con el sistema hospedador minimizando respuestas del sistema inmunitario adversas potenciales. Esto se consigue retirando toda o una parte de la parte de Fc de un anticuerpo de especie ajena o usando un anticuerpo de la misma especie que el sujeto hospedador, por ejemplo, el uso de anticuerpos de hibridomas humanos/humanos. Pueden producirse anticuerpos humanizados (es decir, no inmunogénicos en un ser humano), por ejemplo, reemplazando una parte inmunogénica de un anticuerpo con una
35 parte correspondiente, pero no inmunogénica (es decir, anticuerpos quiméricos). Dichos anticuerpos quiméricos pueden contener la parte de unión a antígeno o reactiva de un anticuerpo de una especie y la parte Fc de un anticuerpo (no inmunogénico) de una especie diferente. Los ejemplos de anticuerpos quiméricos incluyen, pero sin limitación, quimeras de mamífero no humano-ser humano, quimeras de roedor-ser humano, quimeras de murino-ser humano y rata-ser humano.

40 Se conocen bien en la técnica métodos para obtener dichos anticuerpos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos quiméricos humanizados.

45 La composición inmunizante que comprende los anticuerpos de la invención también puede usarse como un medio para potenciar la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos pueden administrarse en cantidades similares a las usadas para otras administraciones terapéuticas de anticuerpo. Por ejemplo, se administra gamma globulina agrupada en un intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg por sujeto. Por lo tanto, los anticuerpos reactivos con los péptidos antígenos de melanoma de la invención pueden administrarse de forma pasiva solos o junto con otras terapias antineoplásicas a un mamífero aquejado de melanoma. Los ejemplos de terapias antineoplásicas
50 incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia, terapia de inmunoterapia adoptiva con TIL. Los anticuerpos o anticuerpos quiméricos descritos en el presente documento también pueden acoplarse con moléculas de toxinas, radioisótopos y fármacos por métodos convencionales. Los ejemplos de toxinas con los que pueden acoplarse los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, ricina o toxina diftérica. Los ejemplos de fármacos o agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, ciclofosfamida o doxorubicina. Los ejemplos de radioisótopos
55 incluyen, pero sin limitación, ¹³¹I. Los anticuerpos conjugados covalentemente con los agentes anteriormente mencionados pueden usarse en inmunoterapia del cáncer para tratar el melanoma.

60 Si el sujeto para inmunizar ya está aquejado de melanoma o melanoma metastásico, la composición inmunizante de la invención puede administrarse junto con otros tratamientos terapéuticos. Los ejemplos de otros tratamientos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, inmunoterapia de linfocitos T adoptiva, coadministración de citocinas u otros fármacos terapéuticos para melanoma.

En una realización de la invención, dicha composición inmunizante que comprende

- 65 (a) al menos un péptido antígeno de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
(b) al menos un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en el presente documento,

- (c) al menos una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (d) al menos un anticuerpo como se ha descrito anteriormente en el presente documento o
- (e) al menos un ácido nucleico que codifica al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención,

5 puede comprender además

- (a') al menos un péptido MART-1 o Melan-A como se ha descrito en el documento EP1630229,
- (b') al menos un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido MART-1,
- (c') al menos una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de (b'),
- (d') al menos un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce específicamente un péptido MART-1, o
- (e') al menos un ácido nucleico que codifica un péptido MART-1.

15 Los ejemplos de péptidos MART-1 incluyen, pero sin limitación, AAGIGILTV (SEC ID N°: 39), EAAGIGILTV (SEC ID N°: 40), AAGIGILTVI (SEC ID N°: 41), ELAGIGILTV (SEC ID N°: 42).

20 La dosis de péptidos antígenos del melanoma de la invención o péptidos MART-1 para administrar a un sujeto pueden ajustarse según sea apropiado dependiendo de, por ejemplo, la enfermedad para tratar, la edad y el peso corporal de dicho sujeto. Los intervalos de péptidos antígenos de melanoma de la invención o péptidos MART-1 que pueden administrarse son de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg por sujeto, las dosis preferidas son de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg por sujeto.

25 La composición inmunizante de la invención puede evaluarse en primer lugar en modelos animales, inicialmente roedores, y en primates no humanos y finalmente en seres humanos. La seguridad de los procedimientos de inmunización se determina buscando el efecto de inmunización en la salud general del animal inmunizado (cambio de peso, fiebre, comportamiento de apetito) y buscando cambios patológicos en las autopsias. Después del ensayo inicial en animales, pueden ensayarse los pacientes con cáncer de melanoma. Se usarían métodos convencionales para evaluar la respuesta inmunitaria del paciente para determinar la eficacia de la composición inmunizante.

30 Otro objeto de la invención es una célula presentadora de antígenos que comprende un antígeno de HLA complejo y un péptido antígeno de melanoma de la invención.

En una realización de la invención, dicho antígeno de HLA complejo es un antígeno de HLA-A2.

35 En una realización de la invención, dicha célula presentadora de antígenos deriva del sujeto para tratar.

40 La expresión "célula presentadora de antígenos" (APC) se refiere a cualquier célula que exprese un antígeno de HLA capaz de presentar el péptido antígeno de melanoma de la invención en su superficie. Se prefieren células dendríticas, que se ha indicado que tienen una capacidad presentadora de antígenos especialmente alta. En otra realización, también pueden usarse APC artificiales tales como células de mamífero (fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos), células de insecto o líneas celulares.

45 Para preparar dichas APC de la invención, se aíslan células que tienen una capacidad presentadora de antígenos del sujeto para tratar, y se someten a pulsos *ex vivo* con al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención para formar un complejo con el antígeno de HLA-A2.

50 En caso de que se usen células dendríticas, las APC de la invención pueden prepararse de la siguiente manera. Se aíslan linfocitos de sangre periférica del sujeto para tratar por el método de Ficoll; se separan células adherentes de células no adherentes; las células adherentes se cultivan después en presencia de GM-CSF e IL-4 para inducir células dendríticas; y las células dendríticas se someten a pulsos cultivando con al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención para obtener las APC de la invención. Las células dendríticas deberían exponerse al péptido antígeno de melanoma durante suficiente tiempo para permitir que los antígenos se internalicen y se presenten en la superficie de células dendríticas. Las células dendríticas resultantes pueden después volver a administrarse al sujeto para tratar. Dichos métodos se describen en los documentos WO93/20186 y EP0563485.

55 Otro objeto de la invención es una composición para inmunoterapia activa que comprende células presentadoras de antígenos que comprenden un antígeno de HLA complejo y un péptido antígeno de melanoma de la invención.

60 En una realización de la invención, dichas células presentadoras de antígenos comprenden un antígeno de HLA-A2 complejo y un péptido antígeno de melanoma de la invención.

Dichas APC pueden estar contenidas preferentemente en solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio de cultivo o similares. La administración puede realizarse, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía hipodérmica o por vía intradérmica.

65 Devolviendo la composición anteriormente descrita para inmunoterapia activa al cuerpo del sujeto, pueden inducirse eficazmente CTL específicos en el paciente que es positivo para *meloe*, y de este modo puede tratarse el tumor.

Otro objeto de la invención es un linfocito T que reconoce específicamente el péptido antígeno de melanoma de la invención.

5 En una realización de la invención, dicho linfocito T es un linfocito T citotóxico.

En otra realización de la invención, dicho linfocito T está restringido a HLA-A2.

En otra realización de la invención, dicho linfocito T es un clon de linfocitos T.

10 En otra realización, dicho linfocito T es un linfocito T modificado genéticamente que expresa un TCR que reconoce específicamente el péptido antígeno de melanoma de la invención.

15 Otro objeto de la invención es una composición para terapia adoptiva que comprende dichos linfocitos T como se ha descrito anteriormente en el presente documento que reconoce específicamente el péptido antígeno de melanoma de la invención.

20 En el caso del melanoma, se ha observado que una inmunoterapia adoptiva en la que se cultivan infiltrados de linfocitos T intratumorales tomados del sujeto para tratar *ex vivo* en grandes cantidades, y después se devuelve al paciente consigue una mejora terapéutico.

25 Se prefiere que los linfocitos T estén contenidos en solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio de cultivo o similares para su mantenimiento estable. La administración puede conseguirse, por ejemplo, por vía intravenosa o por vía intratumoral. Devolviendo a los linfocitos T que reconocen específicamente el péptido antígeno de melanoma de la invención al cuerpo del sujeto, se potencia la toxicidad de dichos linfocitos T en células tumorales en el paciente que es positivo para *meloe*. Las células tumorales se destruyen y de este modo se consigue el tratamiento del tumor.

30 Los ejemplos de dónde pueden aislarse los linfocitos T incluyen, pero sin limitación, linfocitos de células de sangre periférica (PBL), ganglios linfáticos o linfocitos de infiltración tumoral (TIL).

35 Dichos linfocitos pueden aislarse de tumor o sangre periférica del individuo para tratar por métodos conocidos en la técnica y cultivarse *in vitro*. Los linfocitos se cultivan en medio tal como RPMI o RPMI 1640 durante 2-5 semanas, preferentemente durante 2-3 semanas. La viabilidad se evalúa por el ensayo de exclusión de colorante azul de tripano. Los linfocitos se exponen al péptido antígeno de melanoma de la invención durante toda la duración del cultivo.

40 En una realización preferida los linfocitos se exponen al péptido antígeno de melanoma de la invención a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 microgramos (μg)/ml por 10^7 células durante toda la duración del cultivo de linfocitos. Pueden añadirse citocinas al cultivo de linfocitos tales como IL-2.

El péptido antígeno de melanoma de la invención puede añadirse al cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas o células de línea celular de melanoma irradiada alogénica.

45 Después de sensibilizarse al péptido, los linfocitos T se administran al sujeto que necesite dicho tratamiento.

50 Los ejemplos de cómo estos linfocitos T sensibilizados pueden administrarse al mamífero incluyen pero sin limitación, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal o por vía intralesional. Los parámetros que pueden evaluarse para determinar la eficacia de estos linfocitos T sensibilizados incluyen, pero sin limitación, la producción de células inmunitarias en el sujeto que se trata o la regresión tumoral. Se usan métodos convencionales para evaluar estos parámetros. Dicho tratamiento puede proporcionarse junto con citocinas o células genéticamente modificadas (Rosenberg, S. A. *et al.* (1992) *Human Gene Therapy*, 3: 75-90; Rosenberg, S. A. *et al.* (1992) *Human Gene Therapy*, 3: 57-73).

55 Otro objeto de la invención es una composición para terapia adoptiva que comprende linfocitos T restringidos por HLA-A2 que reconoce específicamente el péptido antígeno de melanoma de la invención, que comprende además linfocitos T restringidos por HLA-A2 que reconocen específicamente un péptido MART-1 / Melan-A.

60 Se conocen en la técnica linfocitos T restringidos por HLA-A2 que reconocen específicamente un péptido MART-1 / Melan-A y se han descrito en Vignard *et al.*, 2005.

Otro objeto de la invención es un método para producir linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antígeno de melanoma de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

65 (a) estimular PBMC o linfocitos de infiltración tumoral (TIL) obtenidos de un sujeto con al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención,

- (b) enriquecer la población de linfocitos T específicos para el péptido o los péptidos antígenos de melanoma usados en (a),
- (c) opcionalmente clonar dicha población de linfocitos T específicos para el péptido o los péptidos antígenos de melanoma usados en (a).

5 Puede llevarse a cabo enriquecimiento y/o clonación usando un multímero de MHC/péptido como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La clonación también puede llevarse a cabo por métodos convencionales.

10 En una realización de la invención, los linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antígeno de melanoma de la invención están restringidos por HLA-A2. En dicha realización, puede llevarse a cabo enriquecimiento y/o clonación usando un multímero de HLA-A2/péptido como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

15 Puede llevarse a cabo estimulación de PBMC con al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención solo, o presentado por una célula presentadora de antígenos tal como células dendríticas o células de líneas celulares de melanoma irradiadas alogénicas. Típicamente, también pueden añadirse citocinas tales como IL-2 al cultivo.

20 Otro objeto de la invención es una composición para terapia adoptiva que comprende linfocitos que reconocen específicamente el péptido antígeno de melanoma de la invención para prevenir o tratar el melanoma en un sujeto que lo necesite, en el que dicho linfocitos T van a volver a administrarse al sujeto.

En una realización, dichos linfocitos que reconocen específicamente el péptido antígeno de melanoma de la invención están restringidos por HLA-A2.

25 Otro objeto de la invención es una composición inmunizante que comprende

- (a) al menos un péptido antígeno de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (b) un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido antígeno de melanoma definido en (a) como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (c) una célula hospedadora que comprende un vector de expresión definido en (b) como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (d) un anticuerpo que reconoce específicamente un péptido antígeno de melanoma definido en (a) como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o
- (e) al menos un ácido nucleico que codifica al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención,

35 para prevenir o tratar el melanoma en un sujeto que lo necesite.

Otro objeto de la invención es una composición para inmunoterapia que comprende células presentadoras de antígenos que comprenden una molécula de HLA y un péptido antígeno de melanoma de la invención.

40 En una realización, dicho HLA complejo/péptido es un HLA-A2 complejo/péptido antígeno de melanoma de la invención.

45 La invención también se refiere a un método para tratar el melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de

- (a) al menos un péptido antígeno de melanoma como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (b) un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (c) una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
- (d) un anticuerpo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o
- (e) al menos un ácido nucleico que codifica al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención.

55 La invención también se refiere a un método para tratar el melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T que reconoce específicamente el péptido antígeno de melanoma de la invención. En una realización, dichos linfocitos T están restringidos por HLA-A2.

60 La invención también se refiere a un método para tratar el melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células presentadoras de antígenos que comprenden un antígeno de HLA complejo y un péptido antígeno de melanoma de la invención. En una realización, dicho HLA complejo/péptido es un HLA-A2 complejo/péptido de antígeno de melanoma de la invención.

65 Los inventores han observado que el nivel de expresión de ADNc de *meloe* fue mayor en melanomas que en melanocitos y que la expresión de *meloe* fue muy baja en otras líneas celulares tumorales tales como líneas celulares tumorales de mama o pulmón.

Por lo tanto, un objeto de la invención es *meloe* como un biomarcador de melanoma.

Otro objeto de la invención es un método *in vitro* para diagnosticar un melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende detectar la expresión de al menos uno de:

- 5 - ARNm de *meloe* (SEC ID N°: 1),
- péptido MELOE-1 (SEC ID N°: 4),
- péptido MELOE-2 (SEC ID N°: 5),

en una muestra obtenida de dicho sujeto.

Los ejemplos de métodos para determinar el nivel de transcripción de ADNc de *meloe* incluyen, pero sin limitación, transferencia de Northern, protección de RNasa, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa, PCR en tiempo real.

Están presentes ARNm de *meloe* y proteínas MELOE-1 y MELOE-2 en células de melanoma. Es por lo tanto un aspecto de la invención proporcionar sondas de ácido nucleico de *meloe* para utilizar en la detección de ARN de *meloe* o proteínas MELOE-1 o MELOE-2 o alteraciones en el nivel de ARNm de *meloe* o proteínas MELOE-1 o MELOE-2 en muestras biológicas aisladas de un sujeto aquejado de melanomas. Por alteraciones en el nivel de ARN de *meloe* o proteínas MELOE-1 o MELOE-2, se entiende un aumento o reducción en el nivel de un ARN o proteínas MELOE-1 o MELOE-2 en relación con una muestra de control o la aparición o desaparición del ARNm de *meloe* o proteínas MELOE-1 o MELOE-2 en relación con una muestra de control. La detección en las alteraciones de ARNm de *meloe* o proteínas MELOE-1 o MELOE-2 permitirá el diagnóstico o la evaluación de la patología. Por lo tanto, las alteraciones del nivel de ARNm de *meloe* o proteínas MELOE-1 o MELOE-2 pueden ser predictivas del pronóstico para el mamífero aquejado.

En otra realización, el ácido nucleico de *meloe* de la presente invención puede usarse en hibridación *in situ* en tejido de mamífero para determinar el sitio preciso o sitio subcelular de la expresión del gen *meloe* dentro de un tejido. Un método preferido para marcar la secuencia de ácido nucleico de *meloe* es sintetizar una sonda de ARN marcada con ³⁵S por transcripción *in vitro* utilizando polimerasa SP6. Se conocen en la técnica métodos convencionales para preparación de tejidos para síntesis *in situ* de sondas y detección de señal. La sonda se pone en contacto después con secciones tisulares de mamífero y se realizan análisis *in situ* por métodos convencionales. Los ejemplos de tejidos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, embriones de mamífero, tejidos de mamífero adulto, tales como piel, ganglios linfáticos y retina, muestras de ensayo de biopsia, muestras de ensayo de patología y muestras de ensayo de necropsia. En una realización preferida, pueden usarse sondas *in situ* de *meloe* para evaluar la expresión de ARN de *meloe* en tejido enfermo con respecto a melanoma temprano invasivo para caracterizar las fases de crecimiento radial y vertical de la lesión de melanoma y evaluar los márgenes de la enfermedad dentro del tejido.

En otra realización de la invención, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en inmunoensayos para detectar la proteína MELOE-1 o MELOE-2 en muestras biológicas. En este método, los anticuerpos de la invención se ponen en contacto con una muestra biológica y se detecta la formación de un complejo entre el péptido antígeno de melanoma y el anticuerpo. Los inmunoensayos de la presente invención pueden ser radioinmunoensayo, ensayo de transferencia de Western, ensayo inmunofluorescente, inmunoensayo enzimático, ensayo quimioluminiscente, ensayo inmunohistoquímico y similares. Se conocen en este campo técnicas convencionales para ELISA. Dichos ensayos pueden ser inmunoensayos directos, indirectos, competitivos o no competitivos como se describe en la técnica. Las muestras biológicas apropiadas para dichos ensayos de detección incluyen tejidos de mamífero, melanoma y líneas celulares de melanocitos, piel, retina, ganglios linfáticos, muestras de ensayo de patología, muestras de ensayo de necropsia y muestras de ensayo de biopsia. Pueden aislarse proteínas de muestras biológicas por métodos convencionales.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse por lo tanto en inmunoensayos para detectar proteínas MELOE-1 o MELOE-2 o la alteración en el nivel de expresión de estas proteínas en muestras biológicas aisladas de mamíferos aquejados de una enfermedad o trastorno. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, tejidos de mamífero, muestras de tejido de biopsia, muestras de biopsia de melanoma y ganglio linfático, muestras de patología y tisulares. Los ejemplos de enfermedades que pueden evaluarse por estos inmunoensayos incluyen, pero sin limitación, melanomas y tejidos que son sitios secundarios para metástasis de melanoma. Por alteración en el nivel de expresión, se entiende un aumento o una reducción de la proteína MELOE-1 o MELOE-2 o partes de la misma en relación con una muestra de control. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse por lo tanto en un inmunoensayo para diagnosticar, evaluar o pronosticar a un mamífero aquejado de melanoma.

En otra realización de la invención, pueden usarse antiseros de conejo que contienen anticuerpos que reconocen específicamente los péptidos antígenos de melanoma de la invención para detectar dichos péptidos en Análisis de Transferencia de Western. Usando métodos convencionales, los conejos pueden inmunizarse con al menos un péptido antígeno de melanoma de la invención conjugado con vehículos. Preferentemente, pueden usarse de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg de antígeno en adyuvante, más preferentemente puede usarse aproximadamente 1 mg de antígeno en adyuvante. El animal recibe dosis de refuerzo similares y el título de

antisueros se evalúa por ensayo de ELISA. Se obtienen niveles satisfactorios de antisueros cuando el título de anticuerpo antipeptido alcanza una meseta. Este anticuerpo puede usarse en los inmunoensayos convencionales descritos anteriormente.

5 Otro objeto de la invención es un método para controlar un melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende determinar la frecuencia de linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antigénico de melanoma de la invención.

En una realización de la invención, dichos linfocitos T están restringidos por HLA-A2.

10 En una realización de la invención, la frecuencia de linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antigénico de melanoma de la invención puede determinarse usando un multímero de MHC/péptido como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

15 De acuerdo con la invención, un aumento en la frecuencia de linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antigénico de melanoma de la invención se correlaciona con prevención de la recaída.

Otro objeto de la invención es un kit que comprende:

- 20
- un anticuerpo que reconoce específicamente MELOE-1 o MELOE-2,
 - cebadores o sondas para la detección de ARNm de *meloe*, y/o
 - un multímero de MHC/péptido que comprende un péptido antigénico de melanoma de la invención.

25 En una realización, dicho kit comprende además un soporte sólido, en el que dicho soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en pocillos de bandejas de reacción, tubos de ensayo, perlas de poliestireno, tiras, membranas y micropartículas.

En otra realización, dicho kit comprende además un marcador, en el que dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes y compuestos quimioluminiscentes.

30 Se proporcionan los siguientes ejemplos para el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención.

Descripción de las figuras

35 **Figura 1. Selección y caracterización de clones de linfocitos T.** (A) % de linfocitos T productores de TNF y de linfocitos T positivos para tetrámero HLA-A2/Melan-A_{A27L} en la población de TIL M170 en respuesta a la línea celular de melanoma autóloga. Se incubaron 10⁵ TIL y 2x10⁵ células de melanoma durante 5 horas, en presencia de Brefeldina A, se tiñeron con tetrámero HLA-A2/Melan-A_{A27L}, se fijaron y se tiñeron con anticuerpo anti TNF en un tampón de permeabilización. Se analizaron después 10⁴ linfocitos T por citometría de flujo. (B y C) secreción de TNF por el clon de linfocitos T M170.48 (B) y el clon de CTL M170.51 (C) en respuesta a la línea celular de melanoma autóloga. Se añadieron 10⁴ CTL a 3x10⁴ células de melanoma M170, en presencia de anticuerpos de bloqueo dirigidos contra HLA de clase I, A2 y B/C, diluido a 1/50 (barras negras), 1/500 (barras sombreadas) y 1/5000 barras blancas. Se evaluó la reactividad de clones de CTL por un ensayo de liberación de TNF.

45 **Figura 2.** (A y B) respuesta de TNF del clon de CTL M170.48 (A) y el clon de CTL M170.51 (C) a líneas celulares tumorales HLA-A*0201. Se usó la línea celular M6, HLA-A2 negativa, como un control negativo. (C) respuesta de IFN- γ de los clones de CTL M170.48 y M170.51 a melanocitos HLA-A*0201. La línea celular M170 se añadió como un control positivo.

50 **Figura 3. Caracterización del ADNc que codifica el antígeno reconocido.** (A y B) respuestas de TNF de M170.48 (A) y M170.51 (B) a células COS-7 (relación E/T 1/3) transfectadas con los plásmidos indicados. Se añadieron clones de linfocitos T dos días después de la transfección y se evaluó la reactividad de clones de CTL por un ensayo de liberación de TNF. (C) Comparación de las secuencias de nucleótidos de ADNc de *meloe* y BC008026 y localización de esta secuencia en el gen de HDAC4. Los nucleótidos indicados corresponden a SNP entre la secuencia de *meloe* aislada de líneas celulares tumorales M134 y A498 y la secuencia de *meloe* aislada de las líneas celulares M 117 y SW480, y la secuencia de ADNc BC008026.

60 **Figura 4. Caracterización de péptidos derivados de *meloe* reconocidos por los clones de linfocitos T M170.48 y M170.51 T.** (A) Estructura del ADNc de *meloe*. Las cajas negras corresponden a ORF ensayadas con respecto al reconocimiento por el clon de CTL. (B) respuestas de TNF de M170.48 y M170.51 a células COS-7 (relación E/T 1/3) transfectadas con los plásmidos indicados. Se añadieron clones de linfocitos T 2 días después de la transfección y se evaluó la reactividad de los clones de CTL por un ensayo de liberación de TNF. (C) secuencias de aminoácidos de la ORF 1230-1370 y la ORF 285-404 de *meloe* aislada de la biblioteca de ADNc M134. (D y E) Citotoxicidad del clon de CTL M170.48 (D) y el clon de CTL M170.51 (E) contra linfocitos T2 con pulsos de péptidos. Las células diana se marcaron con cromo durante 60 minutos y se incubaron durante 30 minutos con una serie de los péptidos indicados. Se añadieron clones de linfocitos T a una relación E/T de 10/1 y

después se midió la liberación de cromo después de un periodo de incubación de 4 horas.

Figura 5. Expresión preferente de ADNc de *meloe* en líneas celulares de melanoma medida por qPCR, e influencia de la expresión de *meloe* en la activación de clones de CTL específicos. (A) Se ensayaron cuatro líneas celulares de melanoma, una de cáncer de mama, dos de carcinoma renal y una de cáncer de pulmón por qPCR con respecto a la expresión de *meloe*. Se usó la expresión génica de RPLPO y macroglobulina β 2 como controles internos. La expresión relativa de *meloe* se calculó después de la normalización sobre la eficacia de la reacción de PCR y la expresión media de estos dos genes constitutivos, indicada con respecto a su expresión normalizada en melanocitos. (B) Secreción de TNF por el clon de CTL M170.48 en respuesta a líneas celulares tumorales HLA-A2 no transfectadas (barras blancas), o transfectadas con plásmidos de expresión de *meloe* (barras sombreadas) o *meloe*-1 (barras negras). Se transfectaron transitoriamente células tumorales con 100 ng de cada plásmido, con un kit de reactivo de lipofectamine. Se añadieron 10^4 CTL a 3×10^4 células diana, y se evaluó la reactividad de los clones de CTL por un ensayo de liberación de TNF. (C) Expresión relativa de *meloe* medida por qPCR en 16 tejidos sanos humanos.

Figura 6. Detección de CTL específicos de MELOE-1/A2 y MELOE-2 en TIL infundidos a pacientes de melanoma sin recaída y análisis de la diversidad de repertorio de TIL específicos de MELOE-1. (A) Poblaciones de TIL HLA-A2 marcadas con el tetrámero A2/MELOE-1₃₆₋₄₄. Panel superior: TIL infundidos a pacientes sin recaída y panel inferior: TIL infundidos a pacientes con recaída. Los TIL se coincubaron con tetrámero de MELOE-1 y mAb anti CD8. Los valores indican el % de células positivas para tetrámero entre TIL CD8⁺. (B) Marcaje de linfocitos T específicos de A2/MELOE-2₂₇₋₃₅ en población de TIL M278. Los TIL se marcaron conjuntamente con anticuerpo CD8, tetrámeros A2/MELOE-1₃₆₋₄₄ y A2/ MELOE-2₂₇₋₃₅. Los valores indican la fracción de linfocitos T positivos entre los TIL CD8 positivos. (C) Se evaluó la diversidad de repertorio de poblaciones clasificadas por multímero marcando con 25 mAb anti V β . Los insertos ilustran la pureza de cada población de TIL clasificada, evaluada por marcaje con tetrámero específico de MELOE-1.

Figura 7. Reactividad de TIL específicos de MELOE-1/A2 y MELOE-2 contra líneas celulares tumorales HLA-A2

(A) Lisis de la línea celular de melanoma M170 (símbolos negros) y de la línea celular de carcinoma de pulmón 1355 (símbolos abiertos) por el clon de CTL M170.48 y poblaciones de TIL específicos de MELOE-1. Se cultivaron conjuntamente células tumorales marcadas con ⁵¹Cr con linfocitos T a diversas relaciones E/T. Se midió la liberación de cromo en los sobrenadantes después de un periodo de incubación de 4 horas.
 (B) Producción de citocinas por el clon de CTL M170.48 y poblaciones de TIL específicos de MELOE-1 en respuesta a células de melanoma M170. Se incubaron células efectoras y diana a una relación 1/2 en presencia de Brefeldina A, se tiñeron con anticuerpo anti TNF (barras blancas), anticuerpo anti IFN- γ (barras sombreadas) o anticuerpo anti IL2 (barras negras) y se analizaron 10^4 linfocitos T por citometría de flujo.
 (C) Producción de TNF- α , IFN- γ , GM-CSF e IL-2 por el clon de linfocitos T específico de MELOE-2 (M170.51) y la población específica clasificada por MELOE-2 (s-M278), en respuesta a dos líneas celulares de melanoma HLA-A2 positivas y una línea celular de melanoma HLA-A2 negativa.

Figura 8. Frecuencias de linfocitos T específicos de MELOE-1₃₆₋₄₄ y Melan-A_{A27L} entre PBMC de donantes sanos HLA-A2 y pacientes de melanoma. Se clasificaron aproximadamente 10^8 PBMC con tetrámeros conjugados con PE de acuerdo con un método recientemente descrito (42). Después se recogió la muestra teñida completa en un Facs Canto (BD Immunocytometry Systems) y se analizó con software FlowJo. El porcentaje de células positivas para tetrámero entre los linfocitos CD8⁺ se estimó a partir del número de células positivas para tetrámero en la fracción enriquecida y a partir de la fracción de células CD8⁺ en PBMC totales. En donantes sanos, también se estimaron las frecuencias de linfocitos específicos de Melan-A_{A27L}/A2, como un control interno del método de clasificación.

Figura 9. Análisis fenotípico de linfocitos T específicos de A2/MELOE-1 en circulación *ex vivo* en donantes sanos y pacientes con melanoma. Después de clasificar con tetrámeros conjugados con PE, las preparaciones de linfocitos se tiñeron con un cóctel de marcadores de exclusión conjugados con Pacific blue (CD14, CD16, CD19), CD8^{AmCy}, CD45RA^{PE-Cy7}, CD27^{APC-H7}, CD28 PerCP-Cy5.5 y CD62L^{FITC}, e inmediatamente se analizaron por citometría de flujo. (A y B) Patrón de expresión de CD45RA/CD62L (izquierda) o CD28/CD27 (derecha) clasificados en linfocitos T positivos dobles para CD8/MELOE-1, de donantes sanos (A) y pacientes con melanoma (B). Los números indican la fracción de donantes sanos o pacientes con melanoma con el fenotipo correspondiente.

Figura 10. Citotoxicidad de clones de CTL específicos de MELOE-1 contra células T2 con pulsos de péptidos. Las células diana se marcaron con cromo durante 60 minutos y se incubaron durante 30 minutos con una serie de péptido MELOE-1₃₆₋₄₄. Se añadieron clones de linfocitos T derivados de donantes sanos (A), PBMC de pacientes con melanoma (B) y TIL (C) a una relación de E/T de 10/1 y después se midió la liberación de cromo después de un periodo de incubación de 4 horas. (D) CE50 media de los clones de linfocitos T específicos de MELOE-1 en respuesta al péptido de MELOE-1₃₆₋₄₄, de acuerdo con su origen. Se compararon las CE50 usando análisis estadísticos realizados con InStat 2.01. Los datos se analizaron usando ensayo de comparación de

Kruskal-Wallis. * $p=0,019$, considerado significativo.

Figura 11. Lisis de líneas celulares de melanoma M170 (HLA-A2 positiva, panel superior) y M6 (HLA-A2 negativa, panel inferior) por clones de linfocitos T específicos de MELOE-1 derivados de donantes sanos, PBMC de pacientes con melanoma y TIL. Se cultivaron conjuntamente células tumorales marcadas con ^{51}Cr con linfocitos T a relaciones de E/T 10/1 y 1/1. Se midió la liberación de cromo en los sobrenadantes después de un periodo de incubación de 4 horas.

Ejemplos

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Material y métodos

Líneas celulares y cultivos de TIL

Se expandieron poblaciones de linfocitos T a partir de muestras crioconservadas de TIL (derivado de ganglios linfáticos invadidos por tumor) infundidos a pacientes de melanoma incluidos en un protocolo de fase I/II. Este ensayo clínico se dirigió a la comparación de la supervivencia de pacientes con melanoma de estadio III tratados aleatoriamente por IL-2 solamente o TIL+IL-2, en una situación con adyuvante (16). Las muestras de TIL se expandieron de acuerdo con un procedimiento previamente descrito (32, 33). Los TIL que contenían linfocitos T específicos de tumor se clonaron por dilución limitante (34) y los clones de linfocitos T específicos de tumor se amplificaron como se ha descrito previamente (33). Las líneas celulares de melanoma y línea celular de carcinoma colorrectal C4-A se establecieron respectivamente en la unidad de terapia celular y en el laboratorio de los inventores. Se obtuvieron células de fibrosarcoma de ratón WEHI 164 clon 13 y COS-7 de T. Boon (LICR, Bruselas, Bélgica). Las líneas celulares de carcinoma de ovario (OVCAR-3, 0114) y la línea celular de carcinoma renal A498 fueron un regalo de C. Saï (INSERM U892, Nantes, Francia). Las líneas celulares de carcinoma colorrectal (CaCo-2, Sw480, Sw707, LS174T), la línea celular de carcinoma renal HTC116, la línea celular de carcinoma de mama 734-B, fueron regalos de M. Grégoire (INSERM U601, Nantes, Francia), S. Chouaib (INSERM U487, Villejuif, Francia) y D. Jäger (Klinik und Poliklinik für Onkologie, Zúrich, Alemania). La línea celular de cáncer de mama MCF-7 se obtuvo de la ATCC. Los melanocitos normales (98M09 y 01M08), fueron regalos de M. Regnier (L'Oréal Laboratory, París, Francia). Las líneas celulares EBV-B fueron regalos de H. Vié (INSERM U601, Nantes, Francia).

Análisis funcional de linfocitos T

La actividad citotóxica de linfocitos T se midió en un ensayo 4-h convencional contra células marcadas con ^{51}Cr (células T2 cargadas con péptido o líneas celulares tumorales) (23). Se realizó la medición de TNF producido por linfocitos T en respuesta a células tumorales o células COS-7 transfectadas (19) como se ha descrito previamente, usando células WEHI 164 clon 13 (35). Se produjeron en el laboratorio de los inventores mAbs contra HLA de clase I (clon W6.32), HLA-B/C (clon B1.23.2), HLA-A2 (clon BB7.2) añadido a los cultivos en algunos experimentos, a partir de hibridomas obtenidos de la ATCC para anticuerpos W6.32 y BB7.2 y de F. Lemonier (Instituto Pasteur, Francia) para el anticuerpo B1.23.2. Se realizó tinción intracelular de citocinas como se ha descrito previamente en linfocitos T estimulados (36). Para tinción de citocinas intracitoplasmáticas, después de un periodo de estimulación de 6 horas con células de melanoma a una relación de E:T de 1:2, en presencia de brefeldina A a $10\ \mu\text{g/ml}$ (Sigma, St Louis MO, Estados Unidos), se marcaron linfocitos T con un anticuerpo anti CD8 acoplado a APC (BD Biosciences, Francia) y se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente paraformaldehído al 4 % en PBS (SIGMA). Se tiñeron linfocitos fijados para producción de citocinas usando anticuerpos específicos anti TNF- α , anti-IFN- γ , anti-GM-CSF y anti-IL2 (BD Biosciences, Francia), como se ha descrito previamente. Después de teñir, las células se resuspendieron en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo LSR usando software Cell Quest.

Biblioteca de ADNc y construcciones de ORF

La biblioteca de ADNc M134 se ha insertado en pcDNA3.1 como se ha descrito previamente (20) y se introdujeron por electroporación plásmidos recombinantes en *Escherichia coli* XL1 (Stratagene). Para explorar, se constituyeron 800 grupos de 100 bacterias resistentes a ampicilina. Se extrajo ADN plasmídico de cada grupo con el kit de Miniprep QIAprep Spin (QIAGEN). El plásmido positivo se secuenció por la Instalación de Secuenciación de ADN del IFR 26 (Nantes, Francia). Las diversas ORF de secuencias de *meloe* se generaron por PCR (véase Tabla I para los cebadores). Se diseñaron oligonucleótidos con adaptadores EcoRI y XhoI para subclonar en pcDNA3, y con una secuencia Kozak (gccaccATG) para el cebador superior, y un codón de parada para el cebador inferior.

Péptidos sintéticos

Se obtuvieron péptidos de Eurogentec (Angers, Francia). Se controló la pureza ($> 70\%$ o $> 90\%$ para producción de tetrámeros) por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. Los péptidos se liofilizaron, se disolvieron en DMSO a $10\ \text{mg/ml}$ y se almacenaron a $-20\ ^\circ\text{C}$.

PCR en tiempo real

Se extrajo ARN total de líneas celulares tumorales, melanocitos y líneas celulares de B-EBV por reactivo de Trizol Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia). Se obtuvo ARN de tejidos sanos de Clontech (Francia). La calidad de las muestras de ARN se controló usando un bioanalizador Agilent y todas las muestras mostraron un RIN>7. Se realizó retrotranscripción usando 1 µg de ARN total, hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen). Se llevó a cabo la cuantificación relativa de la expresión de *meloe*, RPLPO y microglobulina β2 usando Brilliant SYBR Green QPCR en el Mx4000 (Stratagene Europe, Ámsterdam, Países Bajos). Se añadieron 10 ng de ADNc de las muestras a la mezcla maestra de SYBR Green (Stratagene para Mx4000) con cebadores directos e inversos (Tabla I) a 200 nM en un volumen final de 25 µl. La termociclación fue una etapa a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 63 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto. La eficacia de la reacción de PCR se determinó con series de ADNc diluido 10 veces de M170, realizadas en paralelo para representar las curvas patrón para *meloe*, RPLPO y microglobulina β2. Se incluyeron series de diluciones por duplicado como patrones en cada ciclo. Los valores de ciclo umbral (*CT*) medios de reacciones de PCR por duplicado se normalizaron para promediar los valores de *CT* para dos genes constitutivos (microglobulina β2 y RPLPO) de las mismas preparaciones de ADNc. La relación de expresión relativa de un gen diana se calculó basándose en la eficacia de PCR (*E*) y la desviación de *CT* entre una línea celular dada (*x*) y una línea celular de referencia (*calibrador*), expresado en comparación con la media de los genes constitutivos (37).

$$\text{Relación} = (E^{\Delta CT \text{ diana}})^{\Delta CT \text{ diana (calibrador -x)}} / \text{media} ((E^{\Delta CT \text{ constitutivo}})^{\Delta CT \text{ constitutivo (calibrador-x)})}$$

Marcaje de tetrámero y Vβ

Se generaron monómeros α3 mutados de HLA-A*0201/MELOE-1 y HLA-A*0201/Melan-A por la instalación de proteínas recombinantes (INSERM U892, Nantes, Francia), como se ha descrito previamente (38). Se incubaron conjuntamente poblaciones de TIL y el clon de linfocitos T M170.48 durante 1 hora a 4 °C en oscuridad con tetrámero de MELOE-1 (10 µg/ml) y mAb de CD8 (5 µg/ml) y se analizaron 10⁴ acontecimientos en un FACSCalibur. Se usó un panel de 25 mAb anti Vβ (Vβ1, -2, -3, -4, -5,1, -5,2, -5,3, -6, -7, -7,2, -8, -9, -11, -12, -13,1, -13,2, -13,6, -14, -16, -17, -18, -20, -21,3, -22 y -23) para analizar la diversidad de poblaciones de TIL clasificadas (Immunotech Beckman-Coulter, Marsella, Francia).

Clasificación de células inmunomagnéticas y expansión de poblaciones clasificadas de linfocitos T

Se incubaron monómeros de HLA-A*0201/MELOE-1 (20 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente con 6,7x10⁶ perlas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads M-280 estreptavidina, DYNAL, Compiègne, Francia) y se lavaron en PBS-0,1 %. Se rotaron 5x10⁶ TIL durante 4 horas a 4 °C con perlas recubiertas con monómeros (23, 38). Después de diez lavados, las células recubiertas con perlas se expandieron usando un protocolo de estimulación de linfocitos T policlonales (33).

Frecuencia y estado de linfocitos T específicos de MELOE-1₃₆₋₄₄ en PBMC HLA-A*0201 de donante sano y paciente con melanoma.

Se recogieron 10⁸ PBMC de donantes sanos HLA-A2 (EFS, Nantes, Francia) o de pacientes con melanoma HLA-A2 (regalo de D. Schadendorf, Universidad de Essen, Alemania y B. Dreno, hospital de Nantes, Francia). Se realizó marcaje con tetrámeros conjugados con PE y clasificación de acuerdo con un método descrito recientemente (42). Se añadió tetrámero de MELOE-1 conjugado con PE a una concentración de 50 µg/ml, y las células se incubaron a 4 °C durante 1 hora, seguido de dos lavados en 15 ml de tampón helado (PBS + BSA 0,1 %). Las células teñidas con tetrámero se resuspendieron después en un volumen de 0,9 ml de tampón, se mezclaron con 0,1 ml de microperlas magnéticas conjugadas con anticuerpo anti PE (Miltenyi Biotech, Francia) y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos, seguido de dos lavados con 10 ml de tampón clasificador. Las células se resuspendieron después en 3 ml de tampón y se pasaron sobre una columna LS imantada (Miltenyi Biotech, Francia). La columna se lavó con 3 ml de tampón tres veces y después se retiró del campo magnético. Las células unidas se eluyeron pasando 5 ml de tampón clasificador a través de la columna con un émbolo. Las fracciones enriquecidas resultantes se resuspendieron en 0,5 ml de tampón clasificador, y se retiró un volumen pequeño para recuento celular mientras que el resto de la muestra se tiñó con un cóctel de anticuerpos marcados con fluorocromo específicos para CD14, CD16, CD19, CD8, CD45RA, CD27, CD28, CD62-L y CD127 (BD Biosciences, Francia). Después se recogió la muestra teñida completa en un Facs Canto (BD Immunocytometry Systems) y se analizó con software FlowJow. El porcentaje de células positivas para tetrámero entre linfocitos CD8⁺ se estimó a partir del número de células positivas para tetrámero en la fracción enriquecida y de la fracción de células CD8⁺ en PBMC totales.

Análisis funcional de linfocitos T

La avidéz relativa de clones de linfocitos T específicos de MELOE-1₂₆₋₄₄ y su reactividad antitumoral se midió respectivamente en un ensayo de 4-h convencional contra células T2 cargadas con péptido marcado con ⁵¹Cr y hacia las líneas celulares de melanoma HLA-A2. Brevemente, las células diana (células de melanoma o T2 pulsadas

con péptidos) se incubaron con 100 μCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Oris Industrie, Gif-sur-Yvette, Francia) a 37 °C durante 1 hora. Para ensayos de reconocimiento de péptidos, se preincubaron células T2 con una serie de concentraciones de péptido MELOE-1₂₆₋₄₄ durante 1 hora a 37 °C. Después del cocultivo de 4 h, se mezclaron 25 μl de sobrenadante con 100 μl de cóctel de centelleo (Optiphase Supermix, Wallak, Reino Unido) para medir el contenido radiactivo. Se comparó la CE50 usando análisis estadístico realizado con InStat 2.01. Los datos se analizaron usando el ensayo de comparación de Kruskal-Wallis, seguido del postensayo de Dunn. $P < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

10 Selección y caracterización de clones de linfocitos T

La población de TIL M170 contenía el 16 % de linfocitos reactivos a melanoma, entre ellos el 5 % eran específicos del epítipo Melan-A/A2 y el 11 % eran de especificidad desconocida (Figura 1A). Esta población de TIL se ensayó después con respecto a reconocimiento de un panel grande de antígenos conocidos transfectados en células COS, con las moléculas del HLA de clase I del paciente M170 (19) y no pudo detectarse ninguna respuesta aparte de la respuesta de Melan-A/A2 (datos no mostrados), lo que sugiere que esta población contenía linfocitos específicos para un nuevo o nuevos antígenos tumorales. Para caracterizarlos, los inventores derivaron clones de linfocitos T CD8⁺ reactivos para tumores por dilución limitante. Ocho de estos clones de CTL mostraron patrones de reactividad coherentes con el reconocimiento de un nuevo o nuevos antígenos y dos de ellos, denominados en lo sucesivo en el presente documento M170.48 y M170.51, se caracterizaron adicionalmente para determinar el contexto de HLA restringiendo su reconocimiento. Como se ilustra por la figura 1B y 1C, el reconocimiento de la línea celular de melanoma autóloga por estos dos clones de CTL se produce en el contexto de HLA-A2. Para establecer la distribución del antígeno diana, los inventores ensayaron la reactividad de clones de linfocitos T para diversas líneas celulares tumorales de HLA-A2 incluyendo melanomas, carcinomas ováricos, carcinomas de pulmón, carcinomas de mama, carcinomas renales y carcinomas de colon, usando un ensayo de liberación de TNF. Como se muestra en la figura 2a y 2B, estos clones de linfocitos T reconocieron todas las líneas celulares de melanoma HLA-A2 ensayadas pero ninguno de los otros tipos de células tumorales HLA-A2. Además, estos dos clones de linfocitos T reconocieron débilmente los melanocitos HLA-A2 (figura 2C). Sin embargo, esta reactividad fue mucho menor que la vista habitualmente con clones de linfocitos T específicos de Melan-A/A2 (datos no mostrados).

30 Identificación del ADNc que codifica el antígeno.

Los inventores exploraron una biblioteca de ADNc derivada de la línea celular de melanoma M134 (20) en células COS-7 cotransfectadas con pHLA-A*0201 para caracterizar el Ag reconocido por los clones de linfocitos T M170.48 y M170.51. Entre 800 grupos de 100 ADNpc ensayados, el mismo grupo de plásmidos resultó positivo para los dos clones de CTL, y el plásmido individual, que codificaba el antígeno reconocido por M170.48 (Figura 3A) y M170.51 (Figura 3B) se recuperó de él después de una etapa de clonación. Este inserto, concretamente *meloe*, que abarca 2128 pb, se secuenció y se descubrió que contenía una cola de poli(A) y que era similar al clon BC008026 aislado por el consorcio NIH MGC (21). Después de la clonación del vector de expresión, la cotransfección de ADNc de BC008026 con HLA A*0201 en COS-7 también indujo el reconocimiento por los clones de linfocitos T M170.48 y M170.51 (Figura 3A y 3B), aunque está dos secuencias difirieron en cuatro SNP (Figura 3C). Para controlar el impacto de estos SNP en el reconocimiento de los dos clones de linfocitos T, los inventores secuenciaron el ADNc aislado de líneas celulares reconocidas (M134, M117) y no reconocidas (A498, SW480), y mostraron que este polimorfismo no afectaba al reconocimiento de líneas celulares tumorales. El análisis de secuencia de *meloe* mostró una colinealidad perfecta con el ADN genómico, obtenida por comparación con la secuencia del genoma humano publicado por Celera (22), que indicó ausencia de corte y empalme. Finalmente, se descubrió que esta secuencia se localizaba en el tercer intrón del gen HDAC-4 (Gene ID N° 9759), en el cromosoma 2, en orientación antisentido en comparación con la secuencia del gen HDAC-4.

50 Identificación de los péptidos reconocidos por clones de linfocitos T M170.48 y M170.51.

El ADNc de *meloe* no contiene una ORF larga, sino múltiples ORF cortas (figura 4A). La ORF potencial descrita por el contorción NIH MGC se localizó entre 486 y 689 pb (21). Los inventores ensayaron esta ORF y tres ORF adicionales (cajas negras en la Figura 4A), con respecto al reconocimiento por M170.48 y M170.51, después de transfección en células COS-7, con el ADNc de HLA-A*0201 (Figura 4B). Las ORF ensayadas se seleccionaron basándose en los resultados preliminares obtenidos en fragmentos de PCR de *meloe* (datos no mostrados).

La ORF 1230-1370 pb codifica la proteína que porta el péptido reconocido por el clon de linfocitos T M170.48 específico, y la ORF 285-404 pb codifica la proteína que porta el péptido reconocido por el clon de linfocitos T M170.51 específico (Figura 4C). Estas ORF codifican respectivamente una proteína de 46 y 39 aminoácidos. Los inventores ensayaron el reconocimiento de diversos péptidos derivados de estas dos secuencias capaces de unirse con el HLA A*0201, con una alta estabilidad como se predice por análisis de BIMAS (<http://www-bimas.cit.nih.gov>).

Se ensayaron dos nonapéptidos, con respecto a su reconocimiento por el clon de linfocitos T M170.48, después de cargar en células T2. Solamente se reconoció la secuencia 36-44 «TLNDECWPA» (Figura 4D y datos no mostrados). Los inventores ensayaron después el reconocimiento de dos péptidos adicionales derivados de este

nonapéptido. Los inventores observaron que la adición de la serina en el extremo C terminal (posición 45) redujo drásticamente la respuesta de su clon de CTL (círculos negros en la Figura 3D) y que la delección de la alanina en el extremo C terminal (posición 44) anuló la respuesta de clones CTL (círculos abiertos en la Figura 4D). En conclusión, el péptido óptimo reconocido por el clon de CTL M170.48 parecía ser el nonapéptido 36-44 (TLNDECWPA), con una lisis semimáxima de 10^{-8} M (cuadrados negros en la Figura 4D).

Se ensayaron varios nonapéptidos con respecto a su reconocimiento por el clon de linfocitos T M170.51, después de cargar en células T2. Solamente se reconoció la secuencia 27-35 «RCPPKPPLA» (Figura 4E y datos no mostrados). Los inventores ensayaron el reconocimiento de péptidos adicionales derivados de este nonapéptido. Los inventores observaron que la adición de la alanina en el extremo C terminal (posición 36) reducía drásticamente la respuesta de su clon de CTL (círculos negros en la Figura 4E) y que la delección de la arginina en el extremo N terminal (posición 27) anulaba la respuesta de clones de CTL (círculos abiertos en la Figura 4D), incluso cuando se añadía la leucina en el extremo C terminal (cuadrados abiertos en la Figura 4D). En conclusión, el péptido óptimo reconocido por el clon de CTL M170.51 parecía ser el nonapéptido 27-35 (RCPPKPPLA), con una lisis semimáxima de 5×10^{-8} M (cuadrados negros en la Figura 4D).

Meloe está sobreexpresado en melanomas

Para explicar la ausencia de reconocimiento de líneas celulares tumorales distintas de melanomas, los inventores compararon el nivel de transcripción de ADNc de *meloe* por qPCR en un panel de líneas celulares tumorales HLA-A2 y melanocitos. El nivel medio de expresión de *meloe* en dos melanocitos de HLA-A2 se usó como una referencia para establecer su expresión relativa en otras líneas celulares. Este análisis mostró que la expresión de *meloe* en melanomas era mayor que en melanocitos, variando los valores de 3 a 34 veces mayor, mientras que esta expresión era significativamente menor en otras líneas celulares tumorales, variando los valores de 5 a 338 veces menor (Figura 5A). Estos resultados muestran que este antígeno está sobreexpresado en melanomas y por lo tanto las proteínas codificadas por la ORF 1230-1370 y 285-404 se llamaron respectivamente "MELOE-1" para "antígeno sobreexpresado en melanoma 1" y MELOE-2 para "antígeno sobreexpresado en melanoma-2". Además, la transfección de ADNc de *meloe* o *meloe-1* en líneas celulares tumorales no reconocidas por HLA-A2 indujo su reconocimiento por el clon de linfocitos T M170.48 (Figura 5B), mostrando que la ausencia de reconocimiento de estas líneas celulares tumorales se debía a la infraexpresión de ADNc de *meloe*. Finalmente, para abordar la cuestión de la expresión de este antígeno en tejidos sanos, los inventores realizaron qPCR en un panel de 16 tejidos. Parece que la expresión de *meloe* en tejidos sanos siempre era menor que en los melanocitos. La mayor expresión de *meloe* se descubrió en cerebro completo y fetal pero permaneció respectivamente 1,5 y 1,8 veces por debajo de su expresión en melanocitos (Figura 4C). En general, estos resultados sugieren que este antígeno podría marcarse como diana con seguridad en protocolos de inmunoterapia en melanoma, siempre que su inmunogenicidad pudiera documentarse.

Presencia de linfocitos específicos de MELOE-1 en poblaciones de TIL infundidos a pacientes sin recaída.

Para abordar la cuestión de la inmunogenicidad de este nuevo epítipo, se usó un tetrámero de HLA-A2/péptido para buscar la presencia de linfocitos específicos entre 30 poblaciones de TIL HLA-A2 derivadas de ganglios linfáticos invadidos por melanoma. Todas esas poblaciones de TIL se han infundido a pacientes con melanoma en una situación con adyuvante, entre 1998 y 2002. Después de este tratamiento, 21 de estos pacientes sufrieron recaídas y 9 permanecieron sin recaídas. Usando un tetrámero de HLA/péptido específico, los inventores detectaron la presencia de linfocitos T específicos de MELOE-1/A2 en poblaciones de TIL 5/9 que se habían infundido a pacientes sin recaída, variando las frecuencias del 0,07 % al 3,8 % entre TIL CD8⁺ (figura 6A, panel superior). Por el contrario, los inventores no observaron la presencia de dichos linfocitos T entre los TIL infundidos a los 21 pacientes HLA-A2 que sufrieron recaídas. Se muestra un ejemplo de 5 de estas 21 poblaciones TIL negativas en la Figura 6A, panel inferior. Estos resultados documentan la existencia de una correlación entre la presencia de linfocitos específicos de MELOE-1 entre TIL infundidos y prevención de recaída ($p < 0,001$), y por lo tanto sugieren la inmunogenicidad potencial de este nuevo epítipo de melanoma HLA-A2. Los inventores también detectaron linfocitos T específicos de MELOE-2 en una población de TIL M278, que también contenía linfocitos específicos de MELOE-1 (Figura 6B).

Finalmente, para abordar la cuestión de la diversidad y reactividad tumoral del repertorio específico de MELOE-1/A2, se clasificaron linfocitos específicos por clasificación inmunomagnética basada en monómeros (23), de las 5 poblaciones de TIL positivas. Los insertos de la figura 6B ilustran la pureza de TIL clasificados, evaluada por marcaje con tetrámeros específicos. Los inventores también intentaron clasificar 5 poblaciones de TIL negativas con perlas recubiertas con monómeros, pero no se obtuvieron células específicas de MELOE-1 (datos no mostrados). Este último resultado documentó formalmente la ausencia de dichas células en estas poblaciones, o al menos mostró que las frecuencias de linfocitos T específicos de MELOE-1 eran demasiado bajas para permitir su purificación por clasificación de multímero. La diversidad de uso de V β TCR de poblaciones clasificadas se evaluó con un panel de 25 anticuerpos anti V β que representan las cadenas V β más frecuentemente expresadas dentro de un repertorio normal. En poblaciones clasificadas M117, M170 y M278, se expresaron significativamente 8 o 6 cadenas V β diferentes (por encima del 1 %) por TIL específicos de MELOE-1/A2, lo que indica la presencia de un repertorio de TCR específico más bien policlonal (Figura 6c). La diversidad de TCR de TIL clasificadas M 134 fue mucho menor, con una fuerte dominancia de linfocitos que expresaban la cadena V β 13.1 (Figura 6C). Esto puede relacionarse con

la baja fracción de linfocitos T específicos de MELOE-1 presentes en esta población antes de su clasificación (0,3 % de TIL CD8⁺, Figura 6A), probablemente escasamente diverso. Finalmente, los inventores no pudieron determinar la cadena V β dominante expresada por TIL clasificados a partir de M180, con el panel de anticuerpos de los inventores. Por lo tanto, no pudo observarse uso de V β dominante dentro de estas tres poblaciones de TIL clasificadas. Finalmente, para apoyar el papel potencial de transferencia de TIL específicos de MELOE-1/A2 en la prevención de la recaída, los inventores estudiaron la reactividad de poblaciones TIL clasificadas en líneas celulares de melanoma HLA-A*0201 que expresaban espontáneamente el antígeno MELOE-1. Todas las líneas de linfocitos T clasificadas fueron líticas contra líneas celulares de melanoma (Figura 7A y datos no mostrados) y produjeron IFN- γ y TNF tras la estimulación por estas células, con niveles similares al clon de CTL M170.48, y en un menor grado IL-2 (Figura 7B y datos no mostrados). Los linfocitos específicos de MELOE-2 clasificados de la población de TIL M278 también eran reactivos contra líneas celulares de melanoma HLA-A2, como se ilustra por la producción de citocinas en respuesta a una estimulación con la línea de melanoma HLA-A2 M170 (Figura 7C).

Frecuencia y estado de linfocitos T específicos de MELOE-1₃₆₋₄₄ en PBMC y TIL de donantes sanos HLA-A2 y pacientes con melanoma.

Se clasificaron 10⁸ PBMC por marcaje tetramérico de acuerdo con el método descrito por Moon *et al.* (20). Las células clasificadas se analizaron inmediatamente por tinción multicolor. La frecuencia de linfocitos T específicos de MELOE-1 entre linfocitos CD8⁺ se dedujo a partir del número total de células clasificadas positivas para CD8/tetramero y el número total de linfocitos CD8 entre las PBMC antes de la clasificación. Como control, se realizó el mismo análisis en linfocitos T CD8 específicos de Melan-A. El número de células positivas tetraméricas recuperadas después de la etapa de clasificación varió entre 50 y 400 para células específicas de MELOE-1 y entre 400 y 4000 para células específicas de Melan-A. Con respecto a donantes sanos, la frecuencia de linfocitos T específicos de MELOE-1₂₆₋₄₄ entre células CD8⁺ varió de 1,8 x 10⁻⁶ a 1,8 x 10⁻⁵, mientras que la de linfocitos T específicos de Melan-A_{A27L} varió de 1,8 x 10⁻⁵ a 2,5 x 10⁻⁴ (Figura 8, símbolos negros). Las frecuencias observadas en pacientes de melanoma eran más bien similares, variando de 2,2 x 10⁻⁶ a 1,7 x 10⁻⁵ para linfocitos T específicos de MELOE-1 y de 2,2 x 10⁻⁵ a 2 x 10⁻⁴ para linfocitos específicos de Melan-A (Figura 8, símbolos abiertos). Después se fenotiparon los linfocitos T específicos de CD8/MELOE-1 con respecto a CD45RA, CD62L, CD28 y CD27 por citometría de flujo multiparamétrica (43, 44).

Los linfocitos T CD8⁺ A2/MELOE-1 en circulación detectados en 4/6 donantes sanos presentaron un fenotipo predominantemente virgen (CD45RA^{alto}/CD28⁺/CD27⁺/CD62L⁺), (Figura 9A), mientras que en 2/6 donantes, las células tetramero⁺ presentaron altas proporciones (69 y 58 %) de linfocitos T de memoria (CD45RA^{bajo}/CD28⁺/CD27⁺/CD62L⁺) (Figura 9A). Con respecto a pacientes con melanoma, los inventores también observaron estos dos fenotipos diferentes. De hecho, los linfocitos T específicos de MELOE-1 de 3/6 pacientes presentaron principalmente un fenotipo virgen (Figura 9B). Por el contrario, en los 3 pacientes restantes, del 59 al 85 % de células específicas de A2/MELOE-1 presentaron un fenotipo de memoria.

Avidez relativa y reactividad tumoral de clones de linfocitos T específicos de MELOE-1

15/18 clonotipos pudieron amplificarse adicionalmente para analizar su avidéz por células T2 cargadas con el péptido específico de MELOE-1. Como se muestra en la figura 4A, la CE50 de los clonotipos derivados de donantes sanos varió de 0,5 a 10⁻³ μ M de péptido MELOE-1₃₆₋₄₄ (Figura 10A). La avidéz de clonotipos específicos de MELOE-1 derivados de PBMC o TIL de pacientes estaba menos dispersa, variando la CE50 respectivamente de 5x10⁻² a 4x10⁻⁴ μ M y de 8x10⁻⁴ a 8x10⁻⁷ μ M (Figura 10B y C). En general, los clonotipos específicos de MELOE-1 derivados de pacientes con melanoma parecían tener una mejor avidéz hacia el péptido MELOE-1₃₆₋₄₄, que los clonotipos específicos derivados de donantes sanos (Figura 10D), aunque todos expresan la cadena V α 2.1. Esta diferencia fue significativa (p=0,019) entre clones de linfocitos T derivados de PBMC de donantes sanos y los derivados de TIL de melanoma.

Después se ensayó la reactividad tumoral de los diferentes clonotipos en líneas celulares de melanoma HLA-A2. La Figura 11 ilustra los resultados obtenidos en una línea celular de melanoma positiva para HLA-A2 (M170: panel superior) y una línea celular de melanoma negativa para HLA-A2 (M6: panel inferior). El clonotipo M171.1 no pudo ensayarse con respecto a reactividad tumoral porque no consiguió expandirse adicionalmente. Todos los clonotipos derivados de pacientes (PBMC y TIL) fueron citotóxicos para la línea celular M170, mientras que solamente 2 de los 5 clonotipos derivados de donantes sanos eran líticos contra esta línea celular (HD1.21 y HD3.38). Estos dos clonotipos presentaron la mejor CE50 de los 5 clonotipos derivados de donantes sanos: respectivamente 10⁻² y 10⁻³ μ M.

Análisis

El gen *melo*e está localizado en el tercer intrón del gen de histona desacetilasa 4 (HDAC-4) y se traduce en orientación antisentido en comparación con el gen de HDAC-4 (24). Hay una perfecta colinealidad entre el gen *melo*e y su ADNc correspondiente, que muestra una ausencia de corte y empalme de este gen. Además, la estructura de este ADNc de 2,1 kb es más bien poco habitual, con múltiples fases abiertas de lectura cortas, en lugar

de una única ORF larga. Dos proteínas respectivamente modificadas por la ORF₁₂₃₀₋₁₃₇₀ (MELOE-1) y la ORF₂₈₅₋₄₀₄ (MELOE-2) contienen péptidos que se reconocieron por clones de CTL derivados de TIL específicos de melanoma, en el contexto de HLA-A*0201. Estos clones de CTL reconocieron todas las líneas celulares de melanoma HLA-A*0201 ensayadas, y en menor grado melanocitos HLA-A*0201. Por otro lado, estos clones de linfocitos T no consiguieron reconocer ninguna de las otras líneas celulares tumorales ensayadas (Figura 2).

El antígeno de *meloe* podría clasificarse en la familia de “antígenos de diferenciación melanocítica”, debido a su expresión en melanocitos y líneas celulares de melanoma (25). No obstante, podría clasificarse también en la familia de antígenos expresados de forma aberrante, debido a la localización particular del gen de *meloe* en el tercer intrón del gen de HDAC-4, siguiendo el ejemplo del antígeno de NA17-A, localizado en un intrón del gen de GnT-V (6). A diferencia de los antígenos de diferenciación clásica tales como Melan-A o tirosinasa (18, 26, 27), los inventores detectaron por PCR cuantitativa una expresión residual del gen *meloe* en otras líneas celulares de cáncer, incluso si este nivel de expresión era demasiado bajo para inducir su reconocimiento por el clon de CTL específico de los inventores, como se ha mostrado recientemente para un epítipo tumoral de próstata de ratón derivado de la histona H4 (28). *Meloe* también difiere de un antígeno de diferenciación clásica por su sobreexpresión en melanomas, en comparación con melanocitos normales. Por lo tanto, parece que *meloe* se sobreexpresa específicamente en melanomas y, por lo tanto, este nuevo antígeno presenta las propiedades tanto de especificidad de tejido como de sobreexpresión en cáncer. Las razones de su sobreexpresión en melanomas podría deberse a la regulación del promotor de *meloe*. Como se ha descrito para el gen MAGE-1, un proceso transitorio y general de desmetilación en tumores podría seguirse de una inhibición persistente de remetilación debido a la presencia de factores de transcripción específicos de melanoma (29). De esta manera, la sobreexpresión de *meloe* en melanomas podría deberse a la hipometilación de su promotor en líneas celulares de melanoma. De otra manera, los factores de transcripción específicos de melanoma, tales como MITF que controla la expresión de los tres antígenos de diferenciación melanocíticos principales (30, 31), también podrían controlar la sobreexpresión de *meloe* en melanomas.

Debido a su expresión ampliamente compartida por líneas celulares de melanoma, y a la existencia de epítomos reconocidos por los clones de CTL reactivos para melanoma en el contexto de HLA-A*0201, los antígenos de MELOE-1 y MELOE-2 podrían ser dianas prometedoras para futuros protocolos de inmunoterapia de melanoma, siempre que su uso siga siendo seguro en pacientes y que su inmunogenicidad pueda documentarse.

Los datos de los inventores proporcionan algunos argumentos con respecto a la seguridad de inmunización de pacientes con este antígeno o de transferencia adoptiva con CTL específicos. De hecho, el nivel de expresión de *meloe* en tejidos sanos es siempre menor que en melanocitos, que se reconocen débilmente por clones de CTL específicos de MELOE-1 y MELOE-2, en un menor grado que por CTL específicos de Melan-A (Figuras 4C, 1C y datos no mostrados). Además, ninguna de las otras líneas celulares de cáncer HLA-A*0201 fue capaz de inducir espontáneamente ninguna reactividad de los dos CTL específicos (Figura 2), incluso después de un tratamiento de 48 horas con IFN- γ (datos no mostrados). El clon de CTL específico de MELOE-1 podría activarse solamente por dichas líneas celulares tumorales cuando se transfectaron previamente por el ADNc de *meloe* o el ADNc codificante de ORF₁₂₃₀₋₁₃₇₀ (Figura 5B), que muestra que el nivel de expresión de *meloe* en otras líneas celulares cancerosas era demasiado bajo para inducir la activación de linfocitos específicos. Siendo este nivel de expresión similar al medido en tejidos sanos por qPCR (Figura 5C), esto sugiere que una inmunización con este antígeno no debería inducir reacciones deletéreas en tejidos sanos, aunque se podría esperar la inducción de algo de vitiligo debido a la expresión de *meloe* en melanocitos.

El segundo punto se refiere a la inmunogenicidad de estos nuevos antígenos especialmente la inmunogenicidad de los epítomos restringidos por HLA-A*0201. Para responder a esta cuestión principal, los inventores comprobaron la presencia de linfocitos específicos de MELOE-1 entre poblaciones de TIL que se habían infundido a pacientes con melanoma de estadio III después de escisión de ganglios linfáticos, en una situación con adyuvantes. En estudios retrospectivos de este protocolo de transferencia adoptivo, ya se ha mostrado que la infusión de TIL específicos de melanoma tuvo un impacto significativo en la prevención de recaída de pacientes tratados (17). Más recientemente se ha descubierto que la supervivencia sin recaída prolongada de pacientes tratados con TIL se correlacionaba con la infusión de linfocitos específicos de Melan-A (14), aunque una fracción significativa de TIL específicos de tumor siguen siendo de especificidad desconocida en varias poblaciones de TIL infundidas a pacientes sin recaída. Los inventores detectaron una fracción significativa de linfocitos específicos de MELOE-1 por marcaje tetramérico, en 5/9 poblaciones de TIL infundidas a pacientes con HLA-A2 que permanecieron sin recaída desde 7 a 13 años, mientras que no pudo observarse ningún linfocito específico de MELOE-1 en 21 poblaciones de TIL infundidas a pacientes con recaída. Resulta interesante que también se han descubierto TIL reactivos para MELOE-2 en poblaciones de TIL M170 y M278 (datos no mostrados). El análisis estadístico de estos resultados realizado por un ensayo de Chi², documenta una correlación entre la prevención de la recaída de pacientes HLA-A2 tratados con TIL y la presencia de CTL específicos de MELOE-1 entre esos TIL ($p < 0,001$). Este resultado principal proporciona un argumento potente a favor de la implicación del antígeno de MELOE-1 en la inmunovigilancia de pacientes tratados por transferencia adoptiva de TIL. Este papel en la inmunovigilancia no se ha dilucidado formalmente para la mayoría de antígenos de melanoma identificados, excepto para Melan-A/MART-1, que parece implicado claramente en respuestas clínicas de pacientes con melanoma tratados por inmunoterapia (10-12, 14, 15). Siguiendo el ejemplo del antígeno Melan-A, es necesario un repertorio de linfocitos T diverso y reactivo a tumor para desarrollar protocolos de

transferencia adoptiva de linfocitos T específicos en pacientes con melanoma, y también para ensayos de vacunación. Los inventores abordaron este último problema analizando la diversidad y reactividad del repertorio específico de MELOE-1 en las 5 poblaciones de TIL que contenían linfocitos T específicos de MELOE-1. Después de la selección de linfocitos T específicos de MELOE-1 de TIL por clasificación inmunomagnética con perlas recubiertas con multímero (23), los inventores mostraron que el repertorio específico de MELOE-1 era diverso en 3/5 poblaciones de TIL, y mucho más limitado para la población de TIL M134, que contenía una fracción baja de linfocitos T específicos de MELOE-1 (Figuras 6A y 6B), que podría explicar esta diversidad más escasa. Los inventores no pudieron determinar la cadena o las cadenas V β dominantes expresadas por TIL clasificados por M180 con su panel de anticuerpos (Figura 6B). El análisis de repertorio de estas poblaciones de TIL no reveló ninguna reaparición de un uso de V β particular, como se ha descrito previamente para el repertorio específico de Melan-A (23). Estas cinco poblaciones de TIL específicas de MELOE-1 fueron tan reactivas como el clon de linfocitos T específico de M170.48 contra líneas celulares de melanoma HLA-A2, como se muestra por lisis (Figura 7A) y producción de IFN- γ y TNF- α en respuesta a células de melanoma y, en menor grado, producción de IL-2 (Figura 7B). Además, los inventores han demostrado recientemente que los linfocitos T específicos de MELOE-1 también podrían seleccionarse y amplificarse a partir de PBMC de pacientes con melanoma (datos no mostrados), que sigue siendo la fuente más conveniente de linfocitos T específicos de tumor utilizable para todos los pacientes HLA-A2 admitidos en protocolos de transferencia adoptiva.

Usando un método recientemente descrito de enriquecimiento tetramérico (42), los inventores han enumerado y fenotipado *ex vivo* linfocitos T específicos de MELOE-1 presentes en donantes sanos HLA-A2 y sangre periférica de pacientes. Los resultados muestran que están presentes linfocitos T específicos de MELOE-1 en cada donante sano y paciente, a frecuencias similares: aproximadamente 10^{-5} entre células CD8⁺. Esta frecuencia es aproximadamente diez veces menor que la frecuencia de linfocitos T específicos de Melan-A. Con la excepción del antígeno Melan-A, pocos estudios han establecido frecuencias *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno tumoral en sangre periférica, evitando sus bajas frecuencias su evaluación directa. No obstante, se han evaluado frecuencias de linfocitos T específicos de MAGE-3/A1 en donantes sanos por un enfoque de dilución limitante y revelan una frecuencia tan baja como 2×10^{-7} entre linfocitos T CD8. Esta frecuencia varió entre 7×10^{-7} y 3×10^{-3} en pacientes que tenían respuestas inmunitarias a una vacunación con un virus recombinante que codificaba el antígeno, mientras que esta frecuencia permaneció a aproximadamente 5×10^{-7} en pacientes no sensibles (45). El único estudio que presentaba una alta frecuencia de CTL específicos para un antígeno específico de tumor se refiere a CTL específicos para antígeno NY-ESO-1 (aproximadamente 2×10^{-4} entre CD8⁺), observado solamente en un paciente con melanoma (46). Por lo tanto, la presencia de linfocitos T específicos de MELOE-1 en pacientes con melanoma HLA-A2, con una frecuencia aproximadamente 10^{-5} entre linfocitos CD8⁺ apoya el desarrollo de protocolos de inmunoterapia que se dirijan a este antígeno, y esto se refuerza por un estudio reciente que demuestra la relevancia funcional de la frecuencia del precursor CD8⁺ para la inmunidad tumoral (47).

REFERENCIAS

1. Kawakami, Y., S. Eliyahu, C. H. Delgado, P. F. Robbins, K. Sakaguchi, E. Appella, J. R. Yannelli, G. J. Adema, T. Miki, y S. A. Rosenberg. 1994. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with *in vivo* tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6458-6462.
2. Van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, y T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647.
3. Gaugler, B., B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, P. Romero, J. J. Gaforio, E. De Plaen, B. Lethe, F. Brasseur, y T. Boon. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 179: 921-930.
4. Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K. H. Meyer zum Buschenfelde, y D. Beach. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269: 1281-1284.
5. Kessler, J. H., N. J. Beekman, S. A. Bres-Vloemans, P. Verdijk, P. A. van Veelen, A.M. Kloosterman-Joosten, D. C. Vissers, G. J. ten Bosch, M. G. Kester, A. Sijts, *et al.* 2001. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J Exp Med* 193 :73-88.
6. Guilloux, Y., S. Lucas, V. G. Brichard, A. Van Pel, C. Viret, E. De Plaen, F. Brasseur, B. Lethe, F. Jotereau, y T. Boon. 1996. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med* 183: 1173-1183.
7. Moreau-Aubry, A., S. Le Guiner, N. Labarriere, M. C. Gesnel, F. Jotereau, y R. Breathnach. 2000. A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma. *J Exp Med* 191: 1617-1624.
8. Jager, E., M. Maeurer, H. Hohn, J. Karbach, D. Jager, Z. Zidianakis, A. Bakhshandeh-Bath, J. Orth, C. Neukirch, A. Necker, *et al.* 2000. Clonal expansion of Melan A-specific cytotoxic T lymphocytes in a melanoma patient responding to continued immunization with melanoma-associated peptides. *Int J Cancer* 86: 538-547.
9. Jager, E., H. Hohn, A. Necker, R. Forster, J. Karbach, K. Freitag, C. Neukirch, C. Castelli, R.D. Salter, A. Knuth, *et al.* 2002. Peptide-specific CD8+ T-cell evolution *in vivo*: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1. *Int J Cancer* 98: 376-388.

10. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, *et al.* 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298: 850-854.
- 5 11. Mackensen, A., N. Meidenbauer, S. Vogl, M. Laumer, J. Berger, y R. Andreesen. 2006. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24: 5060-5069.
12. Meidenbauer, N., J. Marienhagen, M. Laumer, S. Vogl, J. Heymann, R. Andreesen, y A. Mackensen. 2003. Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol* 170: 2161-2169.
- 10 13. Vignard, V., B. Lemercier, A. Lim, M.C. Pandolfino, Y. Guilloux, A. Khammari, C. Rabu, K. Echasserieau, F. Lang, M. L. Gougeon, *et al.* 2005. Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J Immunol* 175: 4797-4805.
14. Benlalam, H., V. Vignard, A. Khammari, A. Bonnini, Y. Godet, M.C. Pandolfino, F. Jotereau, B. Dreno, y N. Labarriere. 2007. Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 56: 515-526.
- 15 15. Yee, C., J. A. Thompson, D. Byrd, S. R. Riddell, P. Roche, E. Celis, y P.D. Greenberg. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16168-16173.
16. Dreno, B., J. M. Nguyen, A. Khammari, M.C. Pandolfino, M. H. Tessier, S. Bercegeay, A. Cassidanius, P. Lemarre, S. Billaudel, N. Labarriere, *et al.* 2002. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 51: 539-546.
- 20 17. Labarriere, N., M. C. Pandolfino, N. Gervois, A. Khammari, M. H. Tessier, B. Dreno, y F. Jotereau. 2002. Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 51: 532-538.
- 25 18. Khammari, A., J. M. Nguyen, M. C. Pandolfino, G. Quereux, A. Brocard, S. Bercegeay, A. Cassidanius, P. Lemarre, C. Volteau, N. Labarriere, *et al.* 2007. Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 56: 1853-1860.
- 30 19. Benlalam, H., N. Labarriere, B. Linard, L. Derre, E. Diez, M. C. Pandolfino, M. Bonneville, y F. Jotereau. 2001. Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *Eur J Immunol* 31: 2007-2015.
20. Godefroy, E., A. Moreau-Aubry, E. Diez, B. Dreno, F. Jotereau, y Y. Guilloux. 2005. alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *J Exp Med* 202: 61-72.
- 35 21. Strausberg, R. L., E. A. Feingold, L. H. Grouse, J. G. Derge, R. D. Klausner, F. S. Collins, L. Wagner, C. M. Shenmen, G. D. Schuler, S. F. Altschul, *et al.* 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16899-16903.
22. Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, *et al.* 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- 40 23. Labarriere, N., N. Gervois, A. Bonnini, R. Bouquie, F. Jotereau, y F. Lang. 2008. PBMC are as good a source of tumor-reactive T lymphocytes as TIL after selection by Melan-A/A2 multimer immunomagnetic sorting. *Cancer Immunol Immunother* 57: 185-195.
- 45 24. Grozinger, C. M., C. A. Hassig, y S. L. Schreiber. 1999. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4868-4873.
25. Boon, T., P. G. Coulie, B. J. Van den Eynde, y P. van der Bruggen. 2006. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24: 175-208.
26. Coulie, P. G., V. Brichard, A. Van Pel, T. Wolfel, J. Schneider, C. Traversari, S. Mattei, E. De Plaen, C. Lurquin, J. P. Szikora, *et al.* 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180: 35-42.
- 50 27. Brichard, V., A. Van Pel, T. Wolfel, C. Wolfel, E. De Plaen, B. Lethe, P. Coulie, y T. Boon. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 178: 489-495.
28. Savage, P. A., K. Vosseller, C. Kang, K. Larimore, E. Riedel, K. Wojnoonski, A. A. Jungbluth, y J. P. Allison. 2008. Recognition of a ubiquitous self antigen by prostate cancer-infiltrating CD8+ T lymphocytes. *Science* 319: 215-220.
- 55 29. De Smet, C., A. Lorient, y T. Boon. 2004. Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. *Mol Cell Biol* 24: 4781-4790.
30. Du, J., A. J. Miller, H. R. Widlund, M. A. Horstmann, S. Ramaswamy, y D. E. Fisher. 2003. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 163: 333-343.
- 60 31. Bentley, N. J., T. Eisen, y C. R. Goding. 1994. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol* 14: 7996-8006.
32. Pandolfino, M. C., N. Labarriere, M. H. Tessier, A. Cassidanius, S. Bercegeay, P. Lemarre, F. Dehaut, B. Dreno, y F. Jotereau. 2001. High-scale expansion of melanoma-reactive TIL by a polyclonal stimulus: predictability and relation with disease advancement. *Cancer Immunol Immunother* 50: 134-140.
- 65 33. Jotereau, F., M. C. Pandolfino, D. Boudart, E. Diez, B. Dreno, J. Y. Douillard, J. Y. Muller, y B. LeMével. 1991.

High-fold expansion of human cytotoxic T-lymphocytes specific for autologous melanoma cells for use in immunotherapy. *J Immunother* (1991) 10: 405-411.

34. Gervois, N., N. Labarriere, S. Le Guiner, M. C. Pandolfino, J. F. Fonteneau, Y. Guilloux, E. Diez, B. Dreno, y F. Jotereau. 2000. High avidity melanoma-reactive cytotoxic T lymphocytes are efficiently induced from peripheral blood lymphocytes on stimulation by peptide-pulsed melanoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 1459-1467.

5 35. Espevik, T., y J. Nissen-Meyer. 1986. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95: 99-105.

36. Jung, T., U. Schauer, C. Heusser, C. Neumann, y C. Rieger. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159: 197-207.

10 37. Pfaffl, M. W., I. G. Lange, A. Daxenberger, y H. H. Meyer. 2001. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *Apmis* 109: 345-355.

38. Bodinier, M., M. A. Peyrat, C. Tournay, F. Davodeau, F. Romagne, M. Bonneville, y F. Lang. 2000. Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat Med* 6: 707-710.

15 39. Hans-Georg Rammensee, Thomas Friede y Stefan Stevanovic'. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing *Immunogenetics*, 41: 178.

40. Sudo T, Kamikawaji N, Kimura A, Date Y, Savoie CJ, Nakashima H, Furuichi E, Kuhara S, Sasazuki T. 1995. Differences in MHC class I self peptide repertoires among HLA-A2 subtypes. *J. Immunol*, 155: 4749-4756.

20 41. Coulie P, Somville M, Lehmann F, Hainaut P, Bresseur F, Devos R, Boon T. 1992. Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells. *International Journal of Cancer* 50: 289-297

42. Moon JJ, Chu HH, Pepper M, *et al.* Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 2007; 27: 203-13.

25 43. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9571-6.

44. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 2006; 211: 214-24.

30 45. Lonchay C, van der Bruggen P, Connerotte T, *et al.* Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14631-8.

46. Valmori D, Dutoit V, Liénard D, *et al.* Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res* 2000; 60: 4499-506.

47. Rizzuto GA, Merghoub T, Hirschhorn-Cymerman D, *et al.* Self-antigen-specific CD8+ T cell precursor frequency determines the quality of the antitumor immune response. *J Exp Med* 2009; 206: 849-66.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSERM LABARRIERE, Nathalie
- 40 <120> NUEVO PÉPTIDO ANTÍGENO DEL MELANOMA Y USOS DEL MISMO
- <130> BEP080461
- <160> 42
- 45 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 2154
- 50 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 514 590 T3

atccccaccc acccggtccc caggatcctc attaggaagc cctcaggagc cctggggtgg 60
 gtctccttgc cctgtgaacg ctccatttgt gttattgaat ccaacataaa tgcagcattg 120
 tcttcagagg tgagcaatgg ccgtggccgg aggtgcgcac gggatgcagg cggcgtgtgc 180
 tgctgttgat tttctctgct ctgctottag cttactttag cagatagtgg agtttcacgt 240
 ggcagtccgg taaaoccaagg cagtgtgaac atcccctccc cacaatgagt gaaaatgcag 300
 gaggtgccgt agcgagaaca gcgacagcat totgcgcatt ggtgagcccc actccccagc 360
 ctcggtgccc accgaagccc cctctggctg cactgtgccca gtgagtccag gctccttctc 420
 agcagaaggt ggctgctctg cagggcccct cgcctccctg ctctcaggg gaccgcact 480
 cttccatgtc cgtagggaga cgcgcaccga gctggagaca cagatctgcg aggagtaact 540
 tgctctcttc accagcactg ccaggggccc atcagcgcca gcacctcca gcatgcgcta 600
 aactgctgga gaagctggag tggctggaag gagccctgcc tgctgcccct cctcctctc 660
 agttgctggc cttggcagct ctagggtgac ccagcagggg cctggaggag taggaagcag 720
 cttcccagct gcagtctgca tcatcctctc tgtgctgtca cagaatggaa ggttttagca 780
 gaaaaaggag tttgtaagcg acattcagaa gatttgggca gcagtttctt ccccatagg 840
 gtctgtctt ttgggagtgg ggagtgctgg gccaggtgct tcgctggctg tttcacaggt 900
 ggtggaattt aagagcagac ttgggtcgag ctgtgaccgt tcaggtgatg cacgcacagg 960
 aggttcagct gtgtgcctgt gaggcaggca ggagcgtcac ccaagcttca gaagagaatt 1020
 ccccggcagc agcgtgccc tcagcatggt ccgtgtctga ctgttttgat tgtctctcag 1080
 tccagttgac aaattccttt taagatgaaa tttgaattaa tttgcagaac ttgtacaaat 1140
 ctccaagaaa acagcttaag gaacagatta aagaatgaat gccttaggaa ttaaagcatt 1200
 aatagctctt gagtagactg gatggaaaga tgagttgtgt aggttatcca gatgaggcta 1260

ES 2 514 590 T3

catccagggg gcaattotta ccttcagagg gcgctgectg tctctcttgg catccaagtg 1320
 agcgcatctc ctccacgctc aatgatgaat gctggcgggc atccctgtga ggaaccttgt 1380
 gatcattttc cattttctgaa aactcccagg tgggtgggggc ccttggccca catcagcatt 1440
 gaccaccccg ggctcagatc tggccagggtg cctgcggtgt gatgggaatt tcagtacact 1500
 gaattttgcc tctgaccctg atgaaatagc ttcgggtggca tttgcatcaa gatcatgtta 1560
 gtgtcatctc tattagatgc tttggagcaa acatgaactt gggtttcctt ttaagatgtc 1620
 ctgtgattcc agattcaggg gaatctgaga aaagtgtgaa gaaagaaaat tccactcggc 1680
 cagccaacct tgggtgtgca gagcctgccc cgccttcccc actttgtcct gagaagctgg 1740
 gtctcccca gcaccagagt tgctgctgct tcccctcggc ctcttggctg ctctcccggc 1800
 cccaagcctg agtgacactc taggattgca gatggcaggc tggctctctg getccccctg 1860
 ccccatgacc ctccacctgc acccagaact ctgggtcctt gctcaggcag ccctgcctc 1920
 cggtgagacg cagcccactg tgggcccctc ccttgggcct gccatcagct cctgtgctcc 1980
 tcggcgcccc agcggctgcc ctgggcccgt tcccacagca cctggcacac agcaggagcc 2040
 atgaatgttc tttgggaact gaatgaggag tggaaatgcg ggcattgcat gtttttgaag 2100
 ttaataaaaa aaatccctta aaagttgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2154

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> péptido antígeno del melanoma 1

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X es L, M, V, I o Q

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X es A, V o L

<400> 2

Thr Xaa Asn Asp Glu Cys Trp Pro Xaa
 1 5

25 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> péptido antígeno del melanoma 2

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)

ES 2 514 590 T3

<223> X es C, L, M, V, I o Q
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (9)..(9)
 <223> X es A, V o L
 <400> 3
 Arg Xaa Pro Pro Lys Pro Pro Leu Xaa
 10 1 5
 <210> 4
 <211> 46
 <212> PRT
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> MELOE-1
 20 <400> 4
 Met Ser Cys Val Gly Tyr Pro Asp Glu Ala Thr Ser Arg Glu Gln Phe
 1 5 10 15
 Leu Pro Ser Glu Gly Ala Ala Cys Pro Pro Trp His Pro Ser Glu Arg
 20 25 30
 Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala Ser Leu
 35 40 45
 <210> 5
 25 <211> 39
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> MELOE-2
 <400> 5
 Met Ser Glu Asn Ala Gly Gly Ala Val Ala Arg Thr Ala Thr Ala Phe
 1 5 10 15
 Cys Ala Leu Val Ser Pro Thr Pro Gln Pro Arg Cys Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Pro Leu Ala Ala Leu Cys Gln
 35 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> péptido antígeno del melanoma 1
 <400> 6
 45

ES 2 514 590 T3

Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala
1 5

5
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

10
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 7

Thr Met Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala
1 5

15
<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 8

Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala
1 5

25
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

30
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 9

Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala
1 5

35
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

40
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 10

Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala
1 5

45
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

50
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 11

ES 2 514 590 T3

Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val
1 5

5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

10
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 12

Thr Met Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val
1 5

15
<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 13

Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val
1 5

25
<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

30
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
35
<400> 14

Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val
1 5

40
<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

45
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 15

Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val
1 5

50
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

55
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 16

ES 2 514 590 T3

Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu
1 5

5 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 17

Thr Met Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu
1 5

15 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 18

Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu
1 5

25 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 19

Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu
1 5

40 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 1
<400> 20

Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu
1 5

50 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

55 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 21

ES 2 514 590 T3

Arg Cys Pro Pro Lys Pro Pro Leu Ala
1 5

5 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 22

Arg Leu Pro Pro Lys Pro Pro Leu Ala
1 5

15 <210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 23

Arg Met Pro Pro Lys Pro Pro Leu Ala
1 5

25 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 24

Arg Val Pro Pro Lys Pro Pro Leu Ala
1 5

40 <210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 25

Arg Ile Pro Pro Lys Pro Pro Leu Ala
1 5

50 <210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

55 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 26

ES 2 514 590 T3

Arg Gln Pro Pro Lys Pro Pro Leu Ala
1 5

5
<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

10
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 27

Arg Cys Pro Pro Lys Pro Pro Leu Val
1 5

15
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 28

Arg Leu Pro Pro Lys Pro Pro Leu Val
1 5

25
<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

30
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
35
<400> 29

Arg Met Pro Pro Lys Pro Pro Leu Val
1 5

40
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

45
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 30

Arg Val Pro Pro Lys Pro Pro Leu Val
1 5

50
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

55
<220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 31

ES 2 514 590 T3

Arg Ile Pro Pro Lys Pro Pro Leu Val
1 5

5 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 32

Arg Gln Pro Pro Lys Pro Pro Leu Val
1 5

15 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 33

Arg Cys Pro Pro Lys Pro Pro Leu Leu
1 5

25 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 34

Arg Leu Pro Pro Lys Pro Pro Leu Leu
1 5

35 <210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 35

Arg Met Pro Pro Lys Pro Pro Leu Leu
1 5

45 <210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

50 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2
<400> 36

ES 2 514 590 T3

Arg Val Pro Pro Lys Pro Pro Leu Leu
1 5

5 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2

<400> 37

Arg Ile Pro Pro Lys Pro Pro Leu Leu
1 5

15 <210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> péptido antígeno del melanoma 2

<400> 38

25 Arg Gln Pro Pro Lys Pro Pro Leu Leu
1 5

30 <210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Péptido MART-1

<400> 39

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

40 <210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Péptido MART-1

<400> 40

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

50 <210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

55 <220>
<223> Péptido MART-1

60 <400> 41

ES 2 514 590 T3

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Ile
1 5 10

5 <210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Péptido MART-1

<400> 42

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido antígeno de melanoma que es una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos de longitud, que comprende el motivo de aminoácidos:
- 5
- TX₂NDECWPX₉ (SEC ID N°: 2)
en el que X₂ es leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X₉ es alanina, valina o leucina,
o
 - RX₂PPKPPLX₉ (SEC ID N°: 3)
- 10 en el que X₂ es cisteína, leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X₉ es alanina, valina o leucina.
2. Un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con la reivindicación **1**, en el que dicho péptido antígeno de melanoma se selecciona del grupo que consiste en MELOE-1 que tiene la secuencia SEC ID N°: 4 y MELOE-2 que tiene la secuencia SEC ID N°: 5.
- 15
3. Un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con la reivindicación **1**, en el que dicho péptido antígeno de melanoma se selecciona del grupo que consiste en péptidos que tienen la secuencia SEC ID N°: 6 a 38.
4. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 3**.
- 20
5. Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación **4**.
6. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une con el péptido antígeno de melanoma de acuerdo con la reivindicación **2**.
- 25
7. Un multímero de MHC/péptido que comprende un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con la reivindicación **3**.
- 30
8. Una composición inmunizante que comprende
- (a) al menos un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 3**,
 - (b) al menos un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación **4**,
 - (c) al menos una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación **5**,
 - (d) al menos un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación **6** o
 - (e) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 3**.
- 35
9. Un linfocito T que reconoce específicamente un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 3**.
- 40
10. Una composición para terapia adoptiva que comprende linfocitos T de acuerdo con la reivindicación **9**.
11. Un método para producir dichos linfocitos T de acuerdo con la reivindicación **9**, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 45
- (a) estimular PBMC o linfocitos de infiltración tumoral obtenidos de un sujeto con al menos un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 3**,
 - (b) enriquecer la población de linfocitos T específicos para el péptido o los péptidos antígenos de melanoma usados en (a),
 - (c) opcionalmente clonar dicha población de linfocitos T específicos para el péptido o los péptidos antígenos de melanoma usados en (a).
- 50
12. La composición para terapia adoptiva de acuerdo con la reivindicación **10** para uso para prevenir o tratar el melanoma en un sujeto que lo necesite, en el que dichos linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antígeno de melanoma van a volver a administrarse al sujeto.
- 55
13. La composición inmunizante de acuerdo con la reivindicación **8** para uso para prevenir o tratar el melanoma en un sujeto que lo necesite.
- 60
14. Un método *in vitro* para diagnosticar un melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende detectar la expresión de al menos uno de:
- ARNm de MELOE (SEC ID N°: 1),
 - polipéptido de MELOE-1 (SEC ID N°: 4),
 - polipéptido de MELOE-2 (SEC ID N°: 5),
- 65

en una muestra obtenida de dicho sujeto.

15. Un método *in vitro* para controlar un melanoma en un sujeto que lo necesite, que comprende determinar la frecuencia de linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antígeno de melanoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 3**.
- 5

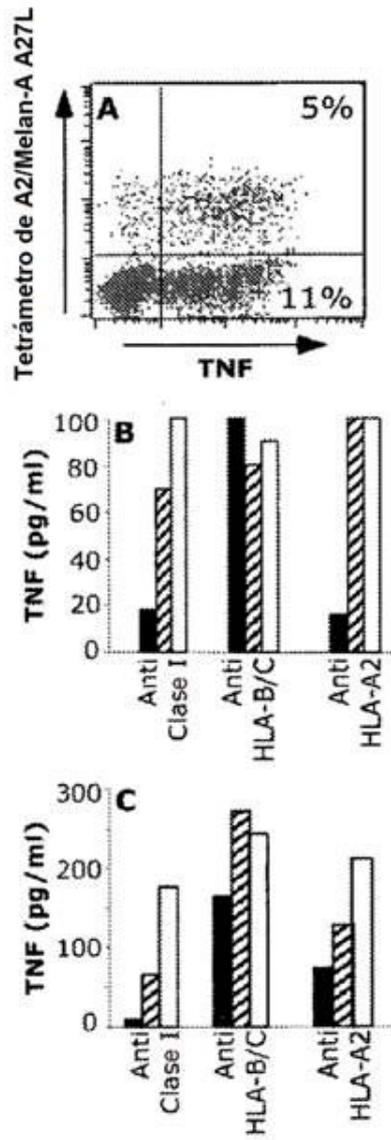


Figura 1

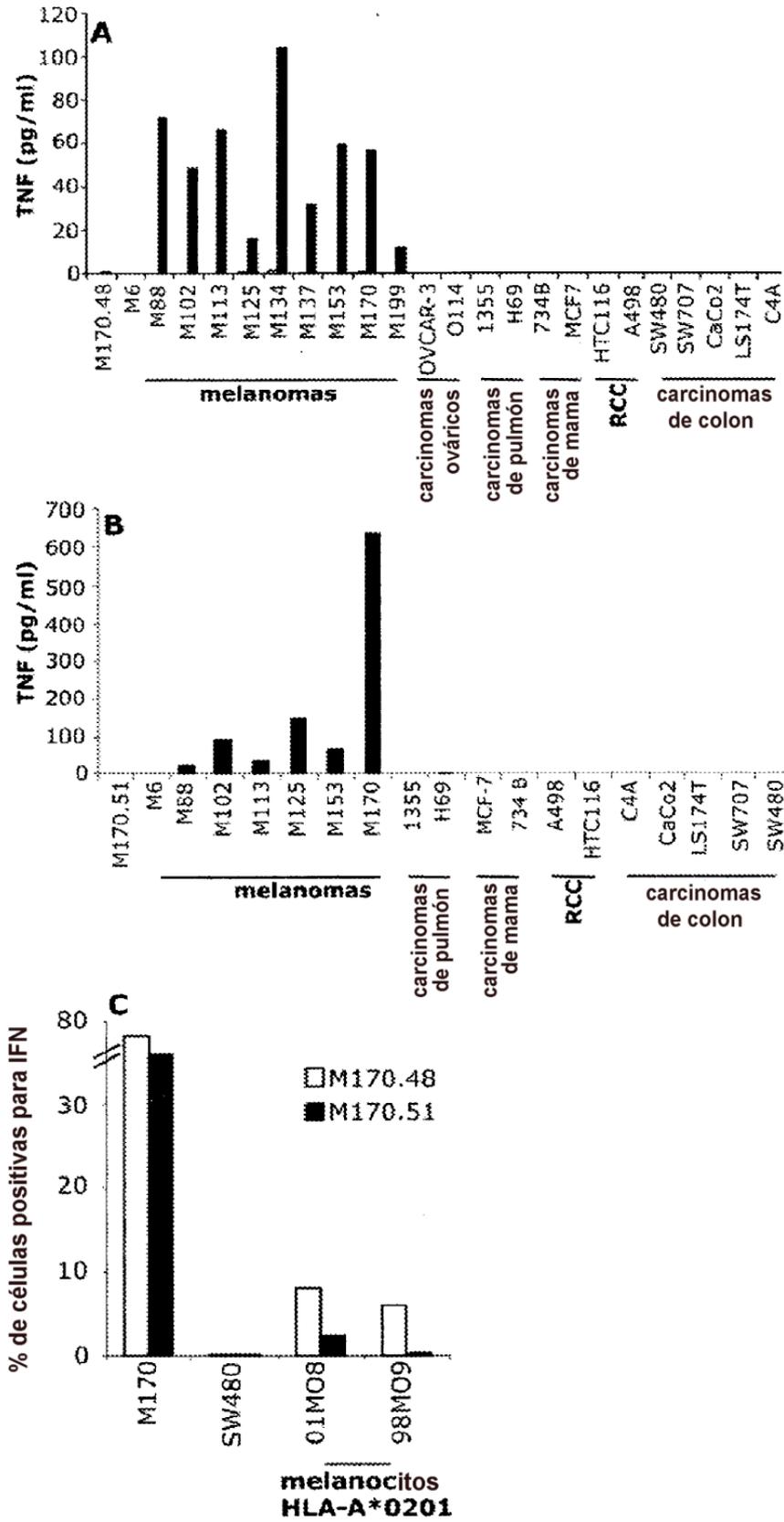


Figura 2

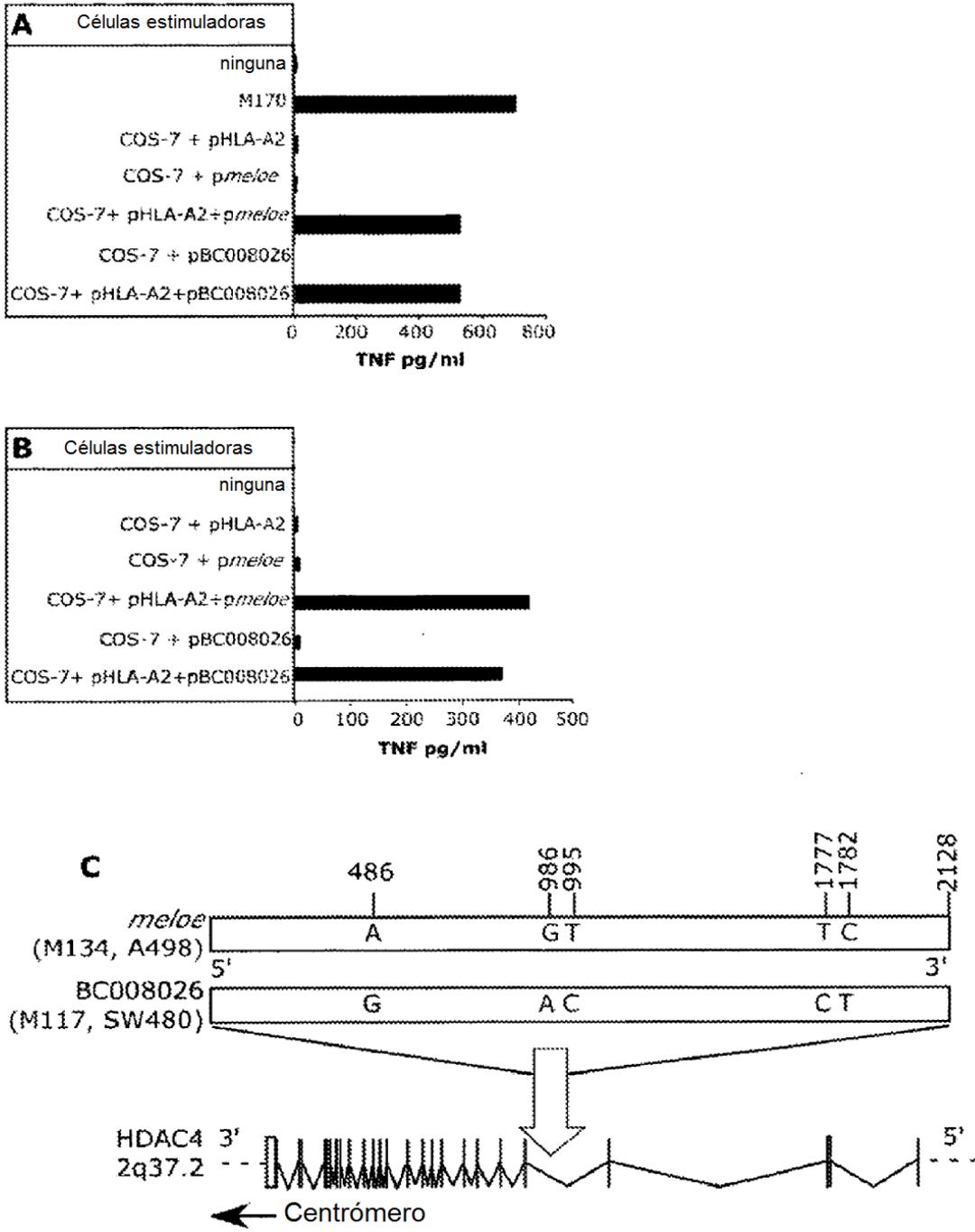


Figura 3

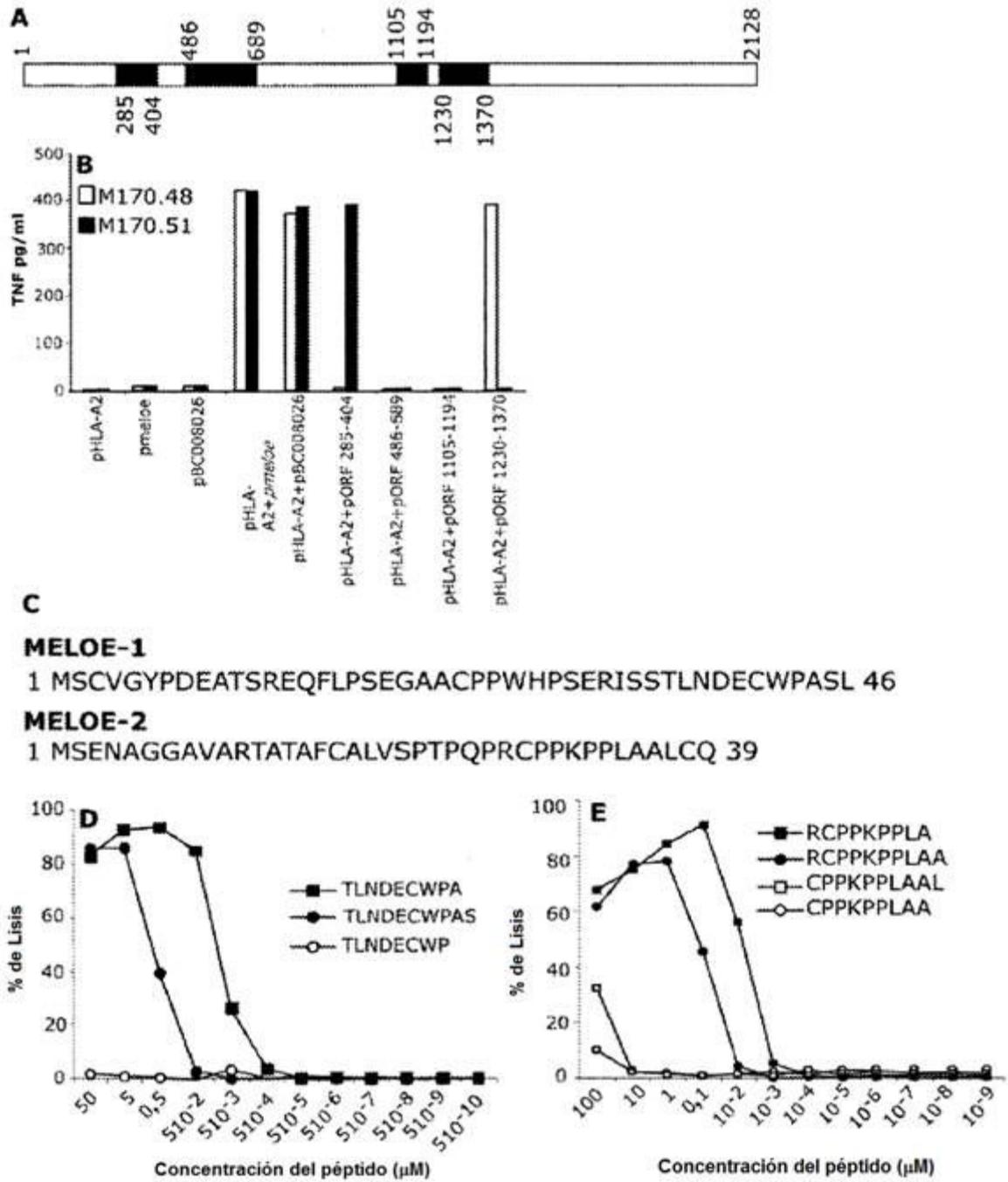


Figura 4

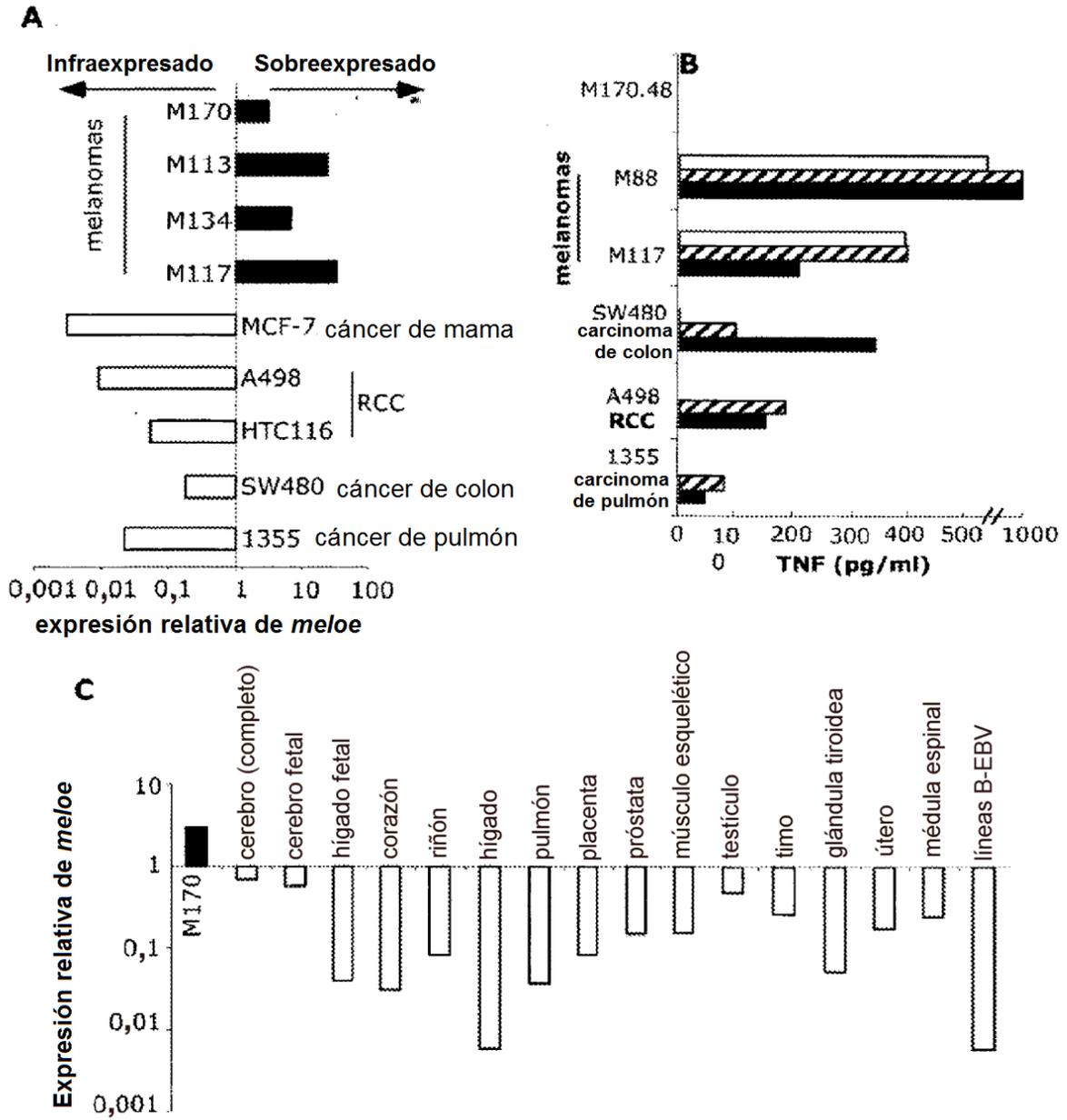


Figura 5

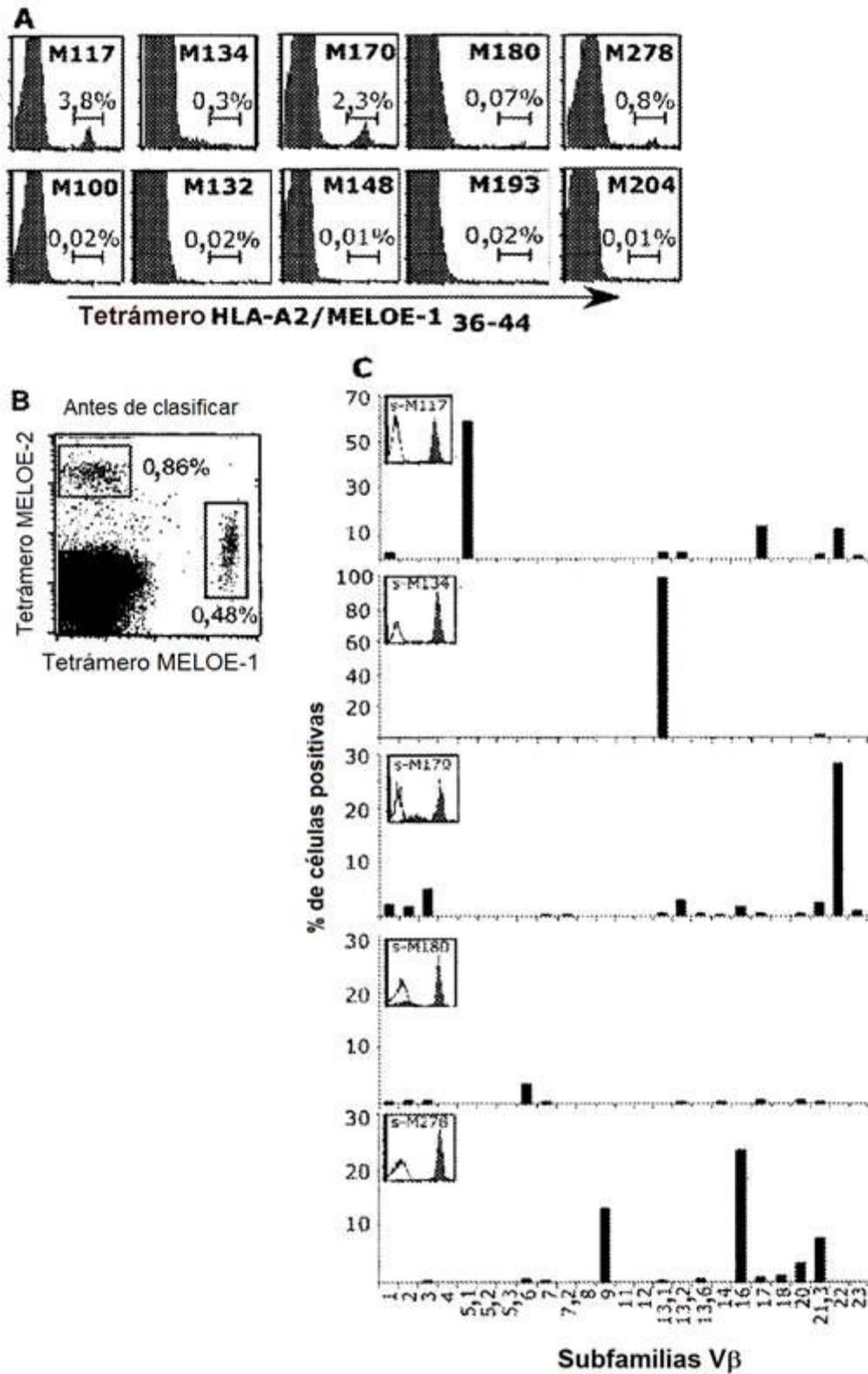


Figura 6

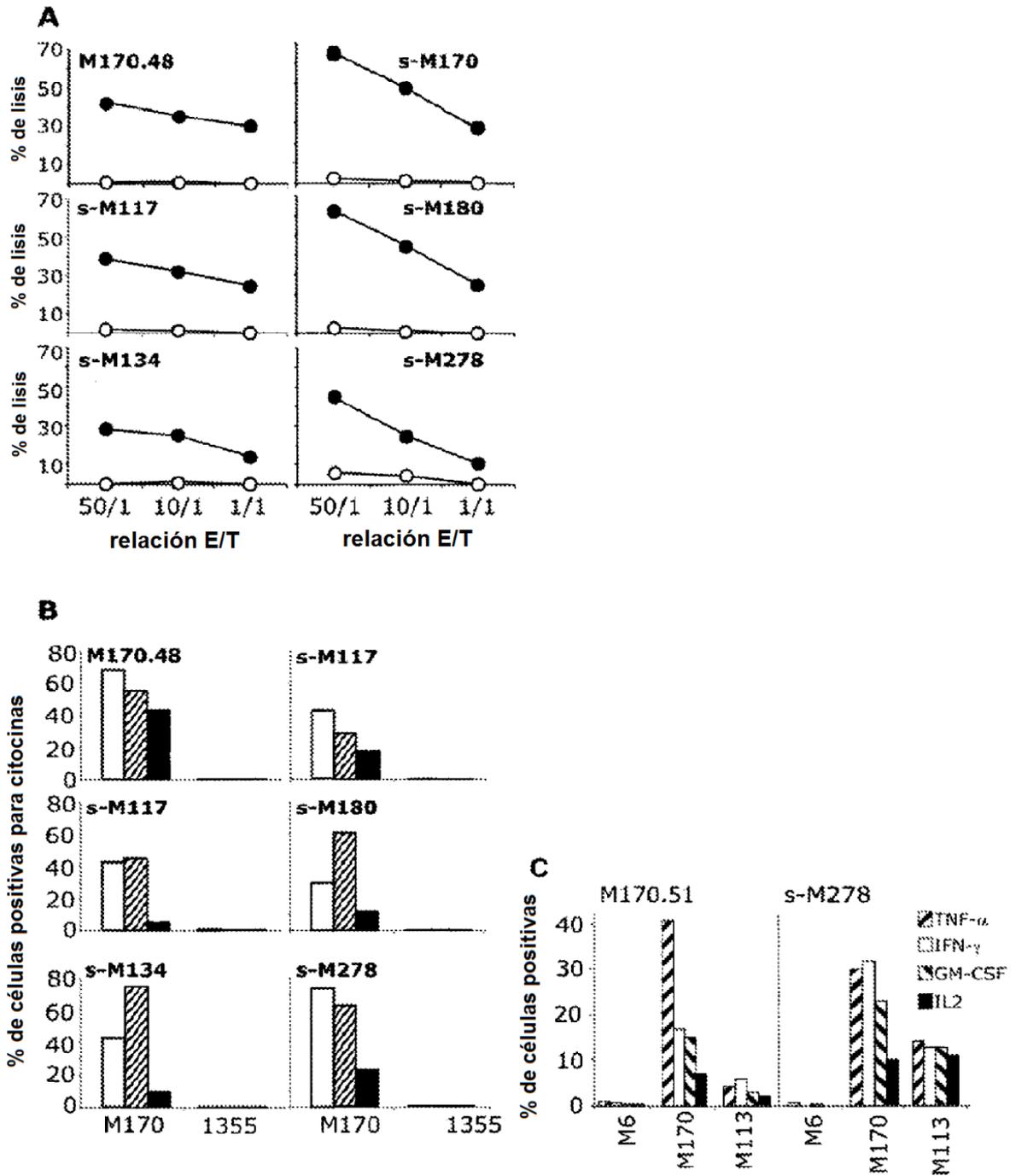


Figura 7

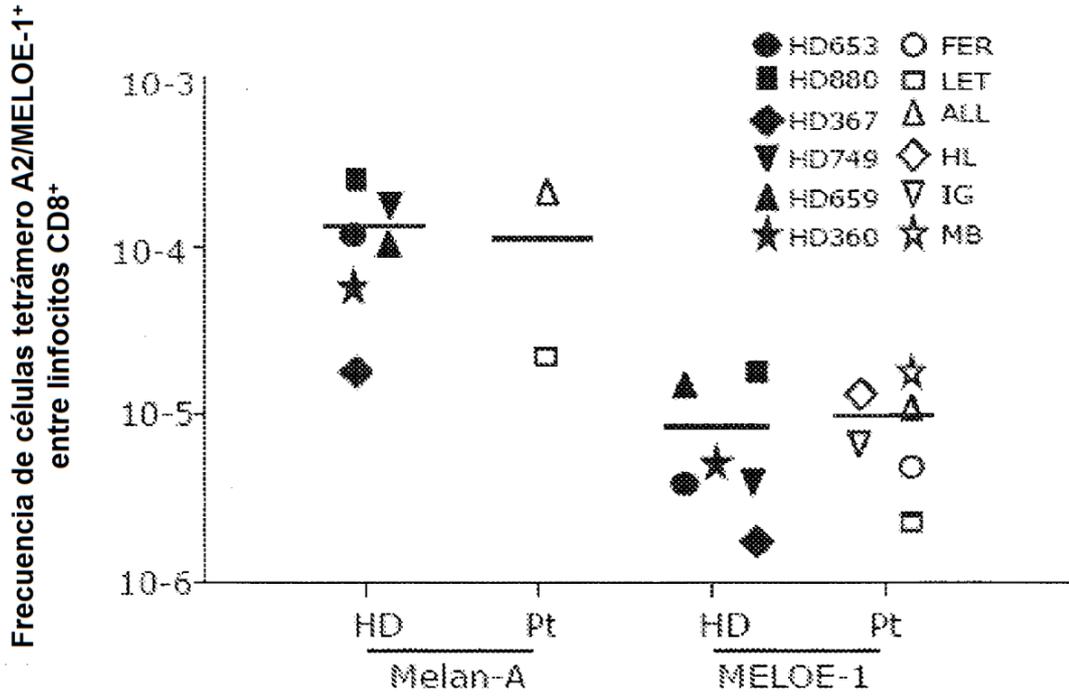


Figura 8

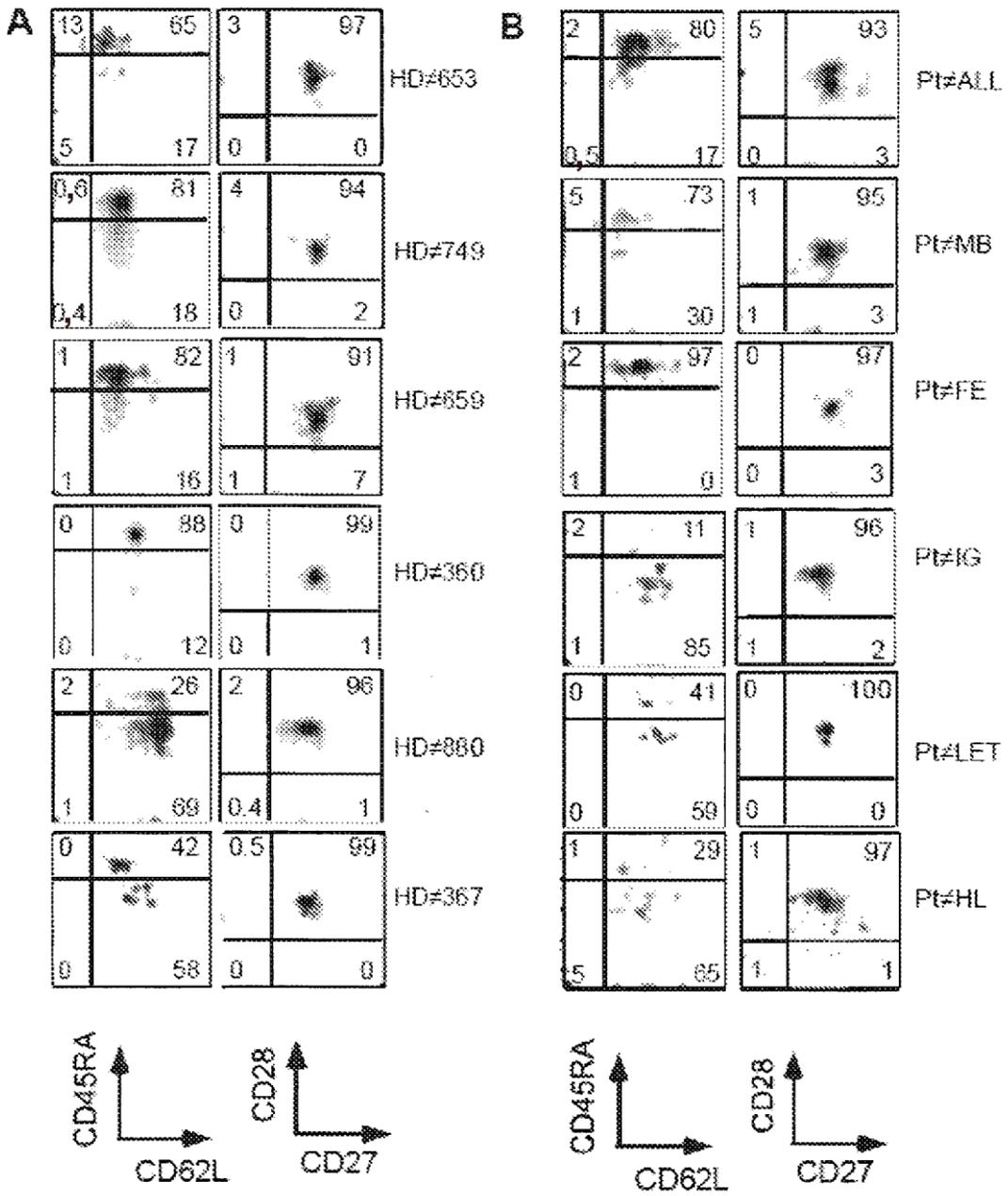


Figura 9

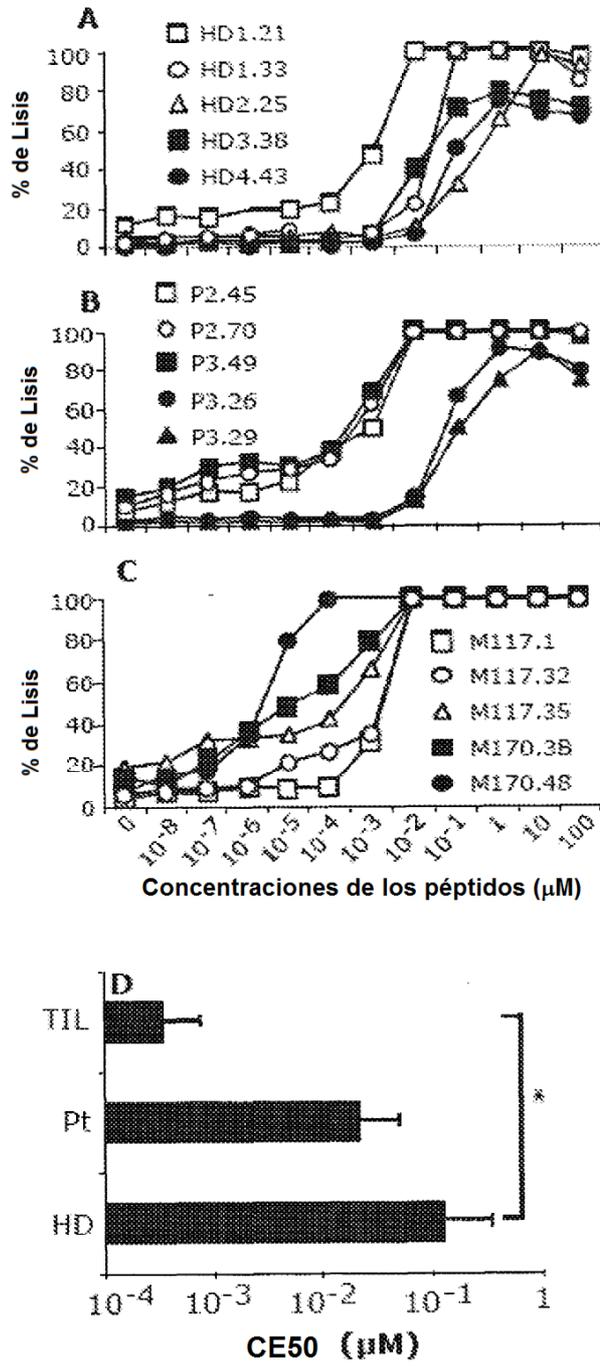


Figura 10

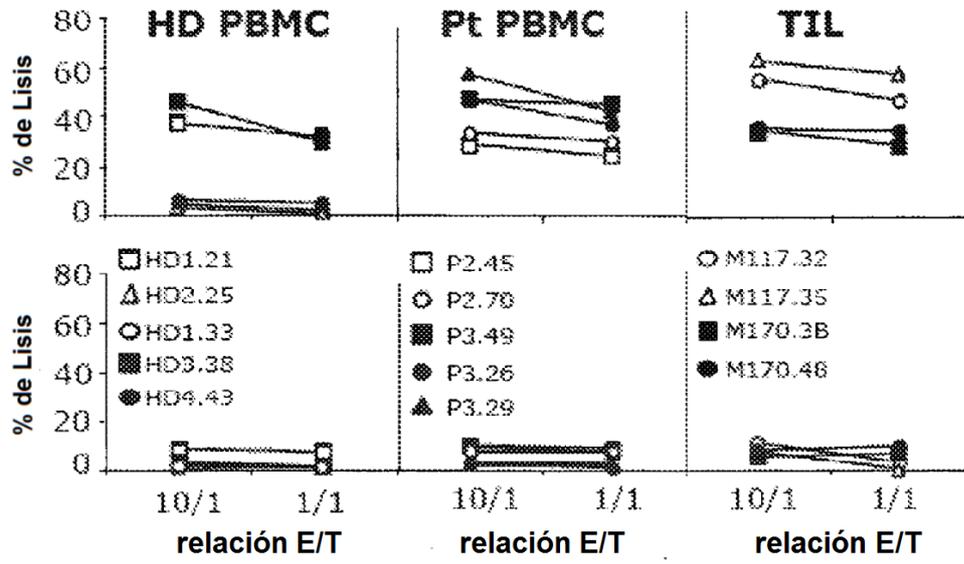


Figura 11