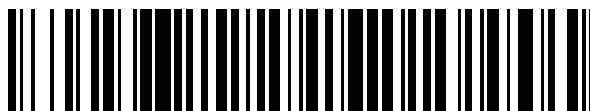


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 159**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2013 PCT/EP2013/076760**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14091034**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013 E 13818713 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2932264**

54 Título: **Antígenos asociados a tumor independientes de MHC novedosos**

30 Prioridad:

**14.12.2012 EP 12197289**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.07.2019**

73 Titular/es:

**BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH  
(100.0%)  
An der Goldgrube 12  
55131 Mainz, DE**

72 Inventor/es:

**SCHADENDORF, DIRK;  
PASCHEN, ANETTE;  
LÜBCKE, SILKE;  
FATHO, MARTINA;  
EBERTS, DANIELA;  
ECHCHANNAOUI, HAKIM;  
LENNERZ, VOLKER;  
WÖLFEL, CATHERINE y  
WÖLFEL, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 721 159 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

Antígenos asociados a tumor independientes de MHC novedosos

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a antígenos asociados a tumor novedosos, que provocan independientemente de una presentación mediante MHC una respuesta de linfocitos T CD8 positivos. Se descubrió que la cadena alfa del receptor de GM-CSF (CSF2RA) está dirigida a clones de linfocitos T reactivos CD8 positivos que podrían detectar las proteínas sobre la superficie de células de melanoma HLA I negativas. Por tanto, la invención proporciona proteínas, fragmentos de proteína y polipéptidos de los antígenos novedosos para su uso en medicina, por ejemplo para el tratamiento, diagnóstico y prevención de una enfermedad tumoral de acuerdo con la reivindicación 10 independiente adjunta. Además, se proporcionan ácidos nucleicos que expresan los antígenos de la invención, agentes de unión específicos para los antígenos de la invención, tales como cadenas del receptor de linfocitos T y linfocitos T aislados que son reactivos contra los antígenos de la invención o que expresan los receptores de linfocitos T de la invención. La divulgación se refiere además a composiciones farmacéuticas, especialmente composiciones de vacuna, que comprenden los antígenos, ácidos nucleicos, agentes de unión o linfocitos T de 15 acuerdo con invención, y procedimientos para la generación de linfocitos T específicamente reactivos para los antígenos de la invención de una manera independiente de MHC.

### Descripción

20 El cáncer aún es la causa principal de muerte a pesar del desarrollo de muchas estrategias de tratamiento incluyendo radiación generalizada y quimioterapia. Además, se sabe que los mecanismos de rechazo de los tumores están mediados por células inmunitarias autólogas, especialmente linfocitos T, que pueden diferenciar entre células cancerosas u células sanas mediante la detección de fragmentos del antígeno asociado a tumor (TAA) mediante la presentación por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos que se expresan específicamente en células tumorales y no en tejido sano pueden clasificarse en cuatro tipos: (I) antígenos mutados que se desarrollan la tumorigénesis por mutaciones puntuales o translocaciones dentro de las células tumorales. 25 Esos antígenos son estrictamente específicos de tumor. (II) antígenos canceroso/de la línea germinal que habitualmente se expresan únicamente dentro de las células germinales de un organismo adulto y no en tejido somático sano. En células cancerosas, sin embargo, debido a la pérdida de regulación epigenética, pueden activarse los genes específicos de células germinales. (III) la diferenciación de antígenos que se expresan en tumores y sus células progenitoras sanas. Las respuestas de CTL contra dichos antígenos a menudo provocan reacciones autoinmunitarias. (IV) el TAA sobreexpresado que muestra únicamente expresión mínima en células sanas mientras que en un tumor esos antígenos se activan fuertemente. Los tumores humanos habitualmente expresan antígenos de diferentes categorías y podrían incluso procesar y presentar distintos péptidos de cada una de estas proteínas mediante sus moléculas respectivas HLA de clase I y de clase II.

35 Las moléculas MHC en seres humanos se mencionan normalmente como moléculas HLA (antígeno de leucocitos humanos). Hay dos clases principales de moléculas HLA: de clase I y de clase II. Los linfocitos T CD8 positivos son habitualmente citotóxicos (por lo tanto, se llaman los linfocitos T citotóxicos = CTL), reconocen péptidos de 9 a 10 aminoácidos que se procesan de forma intracelular a partir de proteínas de cualquier ubicación subcelular y que se presentan sobre la superficie celular mediante moléculas HLA de clase I. En el campo de la inmunología de cáncer humano, las últimas dos décadas han visto esfuerzos intensivos por caracterizar antígenos asociados a cáncer y 40 específicos de cáncer. Además, se han dedicado esfuerzos para el análisis de anticuerpos contra antígenos tumorales humanos. Dichos anticuerpos pueden usarse con fines de diagnóstico y terapéuticos, por ejemplo, en combinación con un agente antineoplásico. Además, actualmente se están desarrollando estrategias prometedoras de tratamientos de vacuna basados en fragmentos antigénicos de MHC de clase I, aunque aún no hay una inmunoterapia satisfactoria disponible para la mayoría de los tipos de cáncer.

45 Hasta la fecha, se conocen únicamente unos pocos ejemplos para el reconocimiento independiente de HLA/MHC de TAA mediante linfocitos T CD4 o CD8 positivos. Barnid y colaboradores, 1989 *PNAS*, describieron el reconocimiento de mucina epitelial en células de cáncer de mama y de ovario. Se descubrió además un reconocimiento independiente de HLA para linfocitos T CD8 positivos reactivos a níquel en dos paciente que padecían dermatitis por contacto (Moulon y col., *J Invest Dermatol* 2003), para un clon de linfocitos T reactivo a melanoma sin identificar el antígeno responsable (Somasundaram y col., *J Transl Med* 2005) y para un clon de linfocitos T reactivo a carcinoma de células renales (Wang y col., *J Immunol* 2008); el antígeno del último se publicó recientemente (Hanada y col., *Blood* 2011).

55 Aunque se identificó un gran número de TAA restringidos a HLA de las cuatro categorías mencionadas anteriormente en el pasado, aún no hay tratamiento satisfactorio basado en una vacunación terapéutica y transferencia adoptiva de los linfocitos T específicos de antígeno disponible. Esto se debe en parte a problemas con respecto a la reproducibilidad de los resultados en estudios clínicos o a la observación de un efecto clínico únicamente insuficiente de la vacuna. Un problema a menudo encontrado en la inmunoterapia del cáncer es además una alteración de la inmunogenicidad en el tejido canceroso. Este llamado "escape inmunitario" puede entenderse basándose en las diferencias fenotípicas encontradas en las células neoplásicas. Por ejemplo, las células tumorales

muestran una capacidad disminuida de procesar y presentar antígenos, tienen una capacidad disminuida de estimular linfocitos T autólogos, muestran regulación por disminución completa de las proteínas inmunogénicas asociadas con células transformadas y/o ninguna o baja expresión de moléculas de adhesión de leucocitos u otras moléculas accesorias y regulación por disminución selectiva de determinados alelos de MHC de clase I y de clase II.

5 Lo último puede afectar a todos los antígenos de clase I/II, o únicamente a parte de ellos. La pérdida de función o expresión parcial de HLA puede estar causada por la pérdida de alelos de HLA individuales, haplotipos de HLA o la pérdida completa de HLA de clase I debido a la pérdida bialélica del gen  $\beta 2m$  (Aptsiauri y col., Cancer Immunol Immunother 2008; Bernal M. y col., Cancer Immunol Immunother 61:1359-71, 2012). Los tumores que han perdido la expresión de HLA, por tanto, son resistentes a cualquier tratamiento basado en linfocitos T dependientes de HLA. De hecho, la alteración de la función de HLA es uno de los mecanismos clave de "escape inmunitario" de las células tumorales y, por tanto, limita la aplicación de inmunoterapia mediada por linfocitos T.

DI BARTOLO V Y COL., "BINDING OF HUMAN GM-CSF TO SYNTHETIC PEPTIDES OF THE ALPHA SUBUNIT OF ITS RECEPTOR", JOURNAL OF RECEPTOR AND SIGNAL TRANSDUCTION RESEARCH, MARCEL DEKKER, NUEVA YORK, NY, EE. UU., (19960101), vol. 16, n.º 1/02, desvela péptidos de unión derivados de CSF2RA.

15 El documento WO 91/02063 desvela un receptor recombinante o sintético para el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y equivalentes bioquímicos y/o biológicos, homólogos o derivados de los mismos.

En vista de la técnica anterior descrita anteriormente, el objeto de la presente invención es proporcionar antígenos asociados a tumor (TAA) novedosos que permitan el desarrollo de tratamientos novedosos del cáncer, y específicamente tratamientos novedosos que eviten el problema de escape inmunitario en las células cancerosas.

20 En un primer aspecto de la presente invención, el objeto anterior se resuelve proporcionando una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa del receptor de GM-CSF (CSF2RA) (SEQ ID NO: 1) para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad tumoral, en el que el tumor está desprovisto de un complejo de MHC de clase I funcional y muestra escape inmunitario por alteración del complejo de presentación de MHC de clase I, en el que dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido puede inducir una respuesta de linfocitos T y/o unirse a un receptor de linfocitos T equivalente, y en el que el tumor expresa CSF2RA (SEQ ID NO: 1) o una proteína que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con CSF2RA.

25 En otra realización de la invención, la proteína, fragmento de proteína o polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de un epítipo complejo de las proteínas CSF2RA nativas como se define en las reivindicaciones. Un epítipo complejo en relación a la invención descrita en el presente documento es un sitio de unión para un agente de unión inmunológico, tal como un receptor de los linfocitos T (TCR) o anticuerpo, que está compuesto de dos o más secuencias de aminoácidos que están en cercana proximidad espacial en las proteínas plegadas tridimensionales nativas, pero que no constituyen una secuencia contigua dentro de la secuencia de aminoácidos lineal del antígeno. Un epítipo complejo, por ejemplo, puede estar compuesto de tramos de las secuencias de aminoácidos de dos estructuras secundarias plegadas una junto a la otra dentro del antígeno, o entre dos cadenas de aminoácidos diferentes de subunidades de contacto de un complejo multiproteínico.

30 Los autores de la presente invención identificaron sorprendentemente las proteínas proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP-2) y cadena alfa del receptor de GM-CSF (CSF2RA) como moléculas expresadas en melanoma (TRP-2) y otros tipos de células malignas (CSF2RA), que se reconocen por linfocitos T de una manera independiente de HLA. Por tanto, los linfocitos T contra los antígenos de la invención proporcionan la sorprendente ventaja de lisar células tumorales que son completamente negativas para la expresión de HLA de clase I o al menos muestran una alteración de la expresión y/o función de HLA. Normalmente dichas células escaparían del rechazo natural del paciente o de un rechazo inmunitario inducido terapéuticamente.

35 La proteína, fragmento de proteína o polipéptido puede comprender al menos 10, preferentemente 15, 20, 50 y mucho más preferentemente 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa del receptor de GM-CSF (CSF2RA) (SEQ ID No: 1), en el que dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido puede inducir una respuesta de linfocitos T y/o unirse a un receptor de los linfocitos T equivalente.

40 En el contexto de la presente invención, los términos "proteína" o "polipéptido" se usan indistintamente e indican un polímero compuesto de monómeros de aminoácido unidos por enlaces peptídicos. Un "enlace peptídico" es un enlace covalente entre dos aminoácidos en que el grupo  $\alpha$ -amino de un aminoácido está unido al grupo  $\alpha$ -carboxilo del otro aminoácido. Todas las secuencias de aminoácidos o polipeptídicas, salvo que se indique de otro modo, se escriben desde el extremo amino (extremo N) hasta el extremo carboxi (extremo C). Los términos "proteína", "fragmento de proteína" y "polipéptido" se refieren a una cadena molecular de aminoácidos, y no se refieren a una longitud específica del producto y, si se requiere, puede modificarse *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, por glucosilación, amidación, carboxilación o fosforilación. Por tanto, entre otros, se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas dentro de la definición de polipéptido.

45 Por supuesto, los fragmentos del polipéptido, resumidos bajo la expresión "fragmento de proteína", también se

- 5 incluyen en la presente invención. Se entiende que los derivados funcionales incluyen polipéptidos que difieren en uno o más aminoácidos en la secuencia global, que tienen eliminaciones, sustituciones, inversiones, inserciones o adiciones. Se han descrito sustituciones de aminoácido que puede esperarse no alteren esencialmente las actividades biológicas e inmunológicas. Los remplazos de aminoácido entre aminoácidos relacionados o remplazos que se han producido frecuentemente en la evolución son, entre otros, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val.
- Además, la expresión "derivados funcionales" de estos polipéptidos también implica las sales de adición de los polipéptidos, amidas de los polipéptidos y específicamente las amidas del extremo C, ésteres y específicamente los ésteres del extremo C y derivados de N-acilo específicamente derivados de acilo del extremo N y derivados N-acetilo.
- 10 En realizaciones preferidas de la invención la proteína, fragmento de proteína o polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
- Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden producirse de forma sintética o por tecnología de ADN recombinante. Los procedimientos para producir polipéptidos sintéticos son bien conocidos en la técnica.
- 15 Con la ayuda las proteínas, fragmentos de proteínas o polipéptidos de acuerdo con la invención, pueden generarse linfocitos T citotóxicos y auxiliares, que desarrollan una actividad citotóxica independiente de MHC específica de antígeno contra las células tumorales que expresan proteínas, fragmentos de proteínas o polipéptidos de la invención y las destruyen. Por lo tanto, estos polipéptidos abren la posibilidad de un nuevo tratamiento eficaz contra los tumores, en cuyo transcurso puede invertirse la supresión de una reacción inmunitaria, que a menudo se observa en pacientes con tumor.
- 20 La divulgación también se refiere a una proteína de fusión compuesta de una de las proteínas, fragmentos de proteínas o polipéptidos mencionados anteriormente y de una segunda proteína o polipéptido. Dichas proteínas de fusión son adecuadas para su uso como agente de diagnóstico o terapéutico o profiláctico o generalmente para una detección y/o manipulación de linfocitos T que reconocen CSF2RA, específicamente independientes de su presentación mediante MHC. Por ejemplo, podrían idearse proteínas de fusión que consisten en una proteína transportadora tal como, por ejemplo, HSA, colágeno u otras proteínas y uno o más de los polipéptidos usados en la invención. Los polinucleótidos que codifican esta proteína de fusión también son materia objeto de la presente divulgación. Se proporciona además la proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con la presente divulgación, que se caracteriza por la presencia de un péptido señal que media el transporte celular de la molécula, cuando se expresa en una célula, hasta el exterior de la membrana celular. Los péptidos señal son conocidos para los expertos en la materia. Más preferentemente, la proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con la presente divulgación comprende un dominio que puede anclar la molécula usada en la invención a la membrana celular. Dicho dominio podría ser un dominio de anclaje a membrana o transmembranario.
- 25 En una realización, la proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con la divulgación se caracteriza porque puede unirse a un receptor de linfocitos T equivalente expresado por un linfocito T independiente de MHC de clase I o un linfocito T independiente de MHC de clase I y II.
- 30 Debido al hallazgo sorprendente de la independencia del reconocimiento de las moléculas para su uso en la invención de la expresión de HLA/MHC, una realización preferida adicional es que la proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con la invención no se presente por MHC de clase I, o MHC de clase I y II. La proteína, fragmento de proteína o polipéptido para su uso en la invención se expresa preferentemente en la superficie celular sin experimentar una fragmentación que se conoce para la presentación de antígenos restringidos a MHC. Por tanto, la presente invención en una realización preferida se referirá a dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido para su uso como se define en las reivindicaciones que, cuando se expresa en una célula HLA/MHC negativa, aún puede inducir una respuesta de los linfocitos T.
- 35 En el contexto de las diversas realizaciones descritas en el presente documento, una proteína, fragmento de proteína o polipéptido no se excluirá del ámbito de la invención, simplemente porque además de su capacidad de mediar una respuesta de linfocitos T independiente de HLA, aún puede procesarse y presentarse por la ruta de MHC/HLA. Únicamente en realizaciones específicas de la divulgación, una proteína, un fragmento de proteína o polipéptido se excluirá, cuando consista en un epítipo de unión a MHC/HLA de clase I y/o II.
- 40 Una enfermedad tumoral de acuerdo con la invención es una enfermedad tumoral que está desprovista de un complejo funcional de MHC de clase I, o que está desprovista de complejos funcionales de MHC de clase I y II, específicamente aquellos tumores que no expresan MHC de clase I, o no expresan MHC de clase I y II. Por tanto, la proteína, fragmento de proteína o polipéptido como se describe en el presente documento es para su uso en la prevención, diagnóstico o tratamiento de un tumor que muestra escape inmunitario por alteración del complejo de presentación de MHC de clase I y/o II.
- 45 Como se usa en el presente documento, el término "tumor" o "enfermedad tumoral" significa tanto tumores benignos como los malignos o neoplasias e incluye melanomas, linfomas, leucemias y sarcomas, siendo ejemplos ilustrativos de tejidos tumorales los cutáneos, tales como melanomas malignos y micosis fungoides; tumores hemáticos tales como leucemias, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, mielocítica aguda o mielocítica crónica; linfomas tales

- como enfermedad de Hodgkin o linfoma maligno; tumores ginecológicos tales como tumores de ovario y de útero; tumores urológicos tales como los de próstata, vejiga o testículos; sarcomas de tejidos blandos, sarcomas óseos o no óseos, tumores de mama; tumores de la pituitaria, la glándula tiroides y la corteza suprarrenal; tumores gastrointestinales tales como los de esófago, estómago, intestino y colon; tumores pancreáticos y hepáticos; papilomas/carcinomas laríngeos y tumores de pulmón.
- El tumor a tratar, diagnosticar o prevenir se caracteriza por la expresión de CSF2RA (SEQ ID NO: 1). O tumores que expresan homólogos de los antígenos mencionados anteriormente, en los que un homólogo se caracteriza por una identidad de secuencia de al menos un 75, 80, 90 o 95 % en comparación con una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1.
- Además, se prefieren dichos tumores de acuerdo con las diversas realizaciones de la divulgación que experimentaron, o están en riesgo de experimentar, mecanismos de escape inmunitario por alteración de la expresión y/o función de los complejos de HLA (de clase I o II o ambos) dentro de la célula tumoral.
- Los tumores preferidos (o neoplasias) de la presente invención con respecto a CSF2RA son tumores de la piel, tal como melanoma. También se desvelan neoplasias hemáticas que expresan CSF2RA, tales como leucemia y tumores sólidos que expresan CSFRA, tales como cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal y cáncer de ovario. Es específicamente preferido en otro aspecto desvelado que la neoplasia que expresa CSF2RA no exprese CSF2RB, o exprese CSF2RB a un nivel significativamente inferior que CSF2RA.
- En una realización preferida de la presente divulgación, la proteína, fragmento de proteína o polipéptido descrito anteriormente de la invención para su uso en medicina, o proteínas usadas dentro de los procedimientos específicos descritos en el presente documento, son las proteínas de longitud completa de CSF2RA, posiblemente con cambios mínimos de aminoácido de preferentemente no más de 50, 40, 30, 20, preferentemente 10, mucho más preferentemente 5 restos de aminoácido en comparación con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. Dichos cambios de secuencia pueden ser adiciones, eliminaciones, sustituciones, inversiones, inserciones o modificación química de uno o más restos de aminoácido.
- En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada, en la que dicha molécula de ácido nucleico (a) tiene una hebra que codifica una proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con la divulgación; (b) tiene una hebra complementaria a la hebra de (a); o (c) tiene una hebra que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula como se describe en (a) o (b). Las condiciones rigurosas son conocidas para los expertos en la materia, específicamente en Sambrook y col., "Molecular Cloning".
- Además de eso, el ácido nucleico opcionalmente tiene secuencias adicionales que son necesarias para expresar la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína, específicamente para la expresión en una célula de mamífero/humana. El ácido nucleico usado puede estar contenido en un vector adecuado para permitir la expresión de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al péptido en una célula. Sin embargo, los ácidos nucleicos también pueden usarse para transfectar una célula presentadora, que no estará restringida a células presentadoras de antígeno clásicas tales como células dendríticas, de tal manera que por sí mismas producen las proteínas correspondientes en su superficie celular.
- Las moléculas de ácido nucleico de la invención son para su uso en medicina como se define en las reivindicaciones.
- También se proporciona un vector o una célula que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento anteriormente, específicamente en el que el vector es para su uso en medicina. También se proporciona una célula que comprende un vector de acuerdo con la invención.
- Otro aspecto de la presente divulgación es el uso de al menos una proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con la invención o un ácido nucleico de acuerdo con la invención para provocar una reacción inmunitaria en relación con un tratamiento de tumor o un tratamiento para prevenir un tumor. En esta ocasión es ventajoso el hecho de que los mecanismos de escape inmunitario frecuentemente observados y tolerancia a TAA en una enfermedad tumoral pueden superarse (o invertirse) mediante el uso de una proteína, fragmento de proteína o polipéptido, o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. El uso de acuerdo con la divulgación también puede emplearse además de los tratamientos establecidos para los tumores.
- Un tratamiento preventivo en el contexto de la invención descrita en el presente documento es de beneficio posiblemente para personas principalmente que tienen un riesgo aumentado de desarrollar un tumor, porque, por ejemplo, están hereditariamente predispuestos o porque ya han tenido un tumor antes. En otra realización, un tratamiento preventivo es de beneficio para un paciente que padece una enfermedad tumoral con riesgo aumentado de haber desarrollado o de desarrollar resistencia al rechazo inmunitario, por, por ejemplo, escape inmunitario mediante la alteración de la función y/o expresión de complejos de HLA de clase I/II.
- Otro aspecto más de la invención se refiere a un agente de unión de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas 8 a 13. En realizaciones preferidas, los agentes de unión como se describe en el presente documento son para su uso en medicina.

5 El agente de unión de la invención es un receptor de linfocitos T (TCR) o un fragmento del mismo. Un TCR es una proteína de superficie celular heterodimérica de la superfamilia de inmunoglobulinas que está asociada con proteínas e invariantes del complejo CD3 implicado en la mediación de la transducción de señales. Los TCR existen en las formas  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , que son estructuralmente similares, pero tienen ubicaciones anatómicas y probablemente funciones bastante distintas. La parte extracelular del  $\alpha\beta$ TCR heterodimérico nativo consiste en dos polipéptidos, cada uno de los cuales tiene un dominio constante próximo a la membrana, y un dominio variable distal a la membrana. Cada uno de los dominios constantes y variables incluye un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios variables contienen los bucles altamente polimórficos análogos a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos.

10 En una realización preferida, el TCR de la invención se caracteriza por comprender una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 8, o por tener una secuencia que es al menos un 75, preferentemente un 80, 90 o 95 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 8. También están comprendidos los linfocitos T que expresan TCR que tienen una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 8, o que tienen una secuencia que es al menos un 75, preferentemente un 80, 90 o 95 % idéntica a las SEQ ID NO: 3 a 8.

15 Un agente de unión de la divulgación se caracteriza, en una realización, por la presencia de todas las secuencias de CDR 1 a 3 representadas para las cadenas alfa o beta respectivas de los TCR CSF2RA de la invención en las figuras y en la tabla 1 a continuación. En esta realización, también se prefiere que el TCR de la divulgación sea un TCR quimérico, por ejemplo, por intercambio completo o en parte del dominio constante humano original con un dominio constante murino (véase la figura 13). Una murinización preferida del dominio constante es el intercambio de al menos la parte extracelular del dominio constante con secuencias murinas.

20 Una realización de la presente divulgación se refiere a un polipéptido de unión a antígeno que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, de uno cualquiera de los TCR-CSF2RA aislados en el contexto de la presente invención y como se representa en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Secuencias de CDR de los clones de receptor de linfocitos T de la divulgación. La SEQ ID NO se da en():

Diana	Cadena de TCR:	CDR1	CDR2	CDR3
CSF2RA	1A.1/506 alfa	DSAIYN (9)	IQSSQRE(10)	CAVGGNDYKLS(11)
CSF2RA	1A.1/506 beta	ENHRY(12)	SYGVKD(13)	CAISEKLAGAYEQY(14)
TRP2	2C/417 alfa	VSGNPY(15)	YITGDNLV(16)	CAVRDMIEGGGNKLT(17)
TRP2	2C/417 beta	MDHEN(18)	SYDVKM(19)	CASSRQGAVGQPQH(20)
CSF2RA	1A3/46 alfa	TSDPSYG(21)	QGSYDQQN(22)	CAMRPHFGNEKLT(23)
CSF2RA	1A3/46 beta	ENHRY(24)	SYGVKD(25)	CAISEKLAGAYEQY(26)

25 El polipéptido de unión a antígeno de la invención es preferentemente un TCR.

Por tanto, también se prefiere una cadena alfa de receptor de linfocitos T que comprenda todas las SEQ ID NO: 9 a 11, o 15 a 17, o 21 a 23.

Por tanto, también se prefiere una cadena beta de receptor de linfocitos T que comprenda todas las SEQ ID NO: 12 a 14, o 18 a 20, o 24 a 26.

30 Preferentemente, un receptor de linfocitos T de la invención, o un fragmento de unión del mismo, tiene una región variable de cadena alfa que comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, y una región variable de cadena beta que comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14. Dicho TCR es un TCR específico para el antígeno CSF2RA. Preferentemente, este TCR es el TCR aislado de CTL 1A.1/506 como se describe en el presente documento en los ejemplos. Dicho receptor puede comprender en una realización, al menos la secuencia de región variable, preferentemente de longitud completa, de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 (cadena alfa) y 4 (cadena beta).

35 Preferentemente, un receptor de linfocitos T de la invención, o un fragmento de unión del mismo, tiene una región variable de cadena alfa que comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 21, 22 y 23, y una región variable de cadena beta que comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 24, 25 y 26. Dicho TCR es un TCR específico para el antígeno CSF2RA. Preferentemente, este TCR es el TCR aislado de CTL 1A3/46 como se describe en el presente documento en los ejemplos. Dicho receptor puede comprender en una realización, al menos la secuencia de región variable, preferentemente de longitud completa, de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 (cadena alfa) y 8 (cadena beta).

40 Otra realización más de la divulgación se refiere a un TCR monocatenario (scTCR) como agente de unión, preferentemente un  $\alpha\beta$ -scTCR. Los TCR monocatenarios (scTCR) son construcciones artificiales que consisten en

45

una hebra individual de aminoácidos. Un scTCR puede comprender un polipéptido de una región variable de una primera cadena de TCR (por ejemplo, una cadena [alfa]) y un polipéptido de una segunda cadena de TCR (por ejemplo, una cadena [beta]) entera (de longitud completa), o viceversa. Además, el scTCR puede comprender opcionalmente uno o más conectores que unen los dos o más polipéptidos juntos. El conector puede ser, por ejemplo, un péptido que une juntas dos cadenas individuales, como se describe en el presente documento. Dicho scTCR puede estar compuesto de cualquiera de las región variable y/o constante que se proporciona en el presente documento.

También se proporciona dicho scTCR de la divulgación, que se fusiona a una citocina humana, tal como IL-2, IL-7 o IL-15.

El agente de unión de acuerdo con la divulgación también puede proporcionarse en forma de un complejo multimérico, que comprende al menos dos moléculas scTCR, en el que dichas moléculas scTCR están cada una fusionada a al menos un resto de biotina, y en el que dicha scTCR están interconectados mediante interacción de biotina-estreptavidina para permitir la formación de dicho complejo multimérico. También se proporcionan complejos multiméricos de un orden superior, que comprenden más de dos scTCR de la invención.

En otra realización preferida, los agentes de unión de la divulgación son un anticuerpo monoclonal biespecífico que comprende los fragmentos de unión de un anticuerpo como se describe en el presente documento anteriormente, y los fragmentos de unión de un segundo anticuerpo que es, por ejemplo, específico para CD3.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica un TCR o agente de unión a antígeno como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, el objeto de la presente invención se resuelve proporcionando un linfocito T aislado, que comprende un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende un agente de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones adjuntas 8 a 13, que se une a una proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones adjuntas 1 a 3, y en el que dicha unión es independiente de la presentación de dicho polipéptido por MHC de clase I o MHC de clase I y II. El linfocito T de la invención es preferentemente CD8 y/o CD4 positivo.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas, no obstante, sin limitarse a ello. En las figuras y secuencias:

**Figura 1:** Fenotipado de HLA de clase I de líneas celulares de melanoma MA-MEL-86A, -86B, -86C y -86F, generadas a partir de distintas metástasis de ganglio linfático de paciente MA-MEL-86 (representación esquemática). MEL-86A expresa todos los alelos de HLA de clase I del paciente, pero resultó ser negativo para la expresión de antígenos de diferenciación de melanocitos. Las inactivaciones bialélicas de los genes de beta2-microglobulina ( $\beta 2m$ ) debido a diferentes mutaciones provocaron una pérdida completa de expresión superficial de moléculas HLA en MA-MEL-86B y -F. MA-MEL-86C ha perdido la expresión de un haplotipo (el "azul") de HLA de clase I.

**Figura 2:** Reconocimiento de diferentes líneas de melanoma MA-MEL-86 mediante cultivos de células tumorales de linfocitos mixtos generados independientemente (MLTC). Se generaron varios MLTC diferentes por estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con la línea de melanoma MA-MEL-86A (A) o -86C (B). Los MLTC sensibles (20 000/pocillo) se ensayaron entonces para el reconocimiento de MA-MEL-86A, -86B y -86C (50 000 células/pocillo), así como líneas celulares de control mediante el uso de ensayos ELISpot de 20h-IPN- $\gamma$ .

**Figura 3:** Cribado de colección de ADNc usando MLTC 1A.1. Se aplicó MLTC 1A.1 al cribado de la colección de expresión de ADNc construida a partir de la línea celular MA-MEL-86A. Parte izquierda: Las imágenes muestran secciones aumentadas de placas de ELISpot que contienen pocillos positivos. Parte derecha: Diagramas que muestran los resultados de los análisis de los ensayos. (A) Sección del ensayo en placa ELISpot de combinaciones de 100 ADNc por pocillo que comprende las combinaciones n.º 701-796. Después de la cotransfección de estas combinaciones de ADNc junto con ADNc de HLA-A\*24:02 en células 293T, MLTC 1A.1 reconoció transfectantes que expresaban la combinación n.º 709 (círculo rojo). Las combinaciones de 10 ADNc por pocillo derivadas de la combinación n.º 709 100x ensayada de la misma manera identificaron las combinaciones n.º 39 y n.º 51 que se reconocen por los linfocitos T (B). La combinación n.º 39 se eligió para subclonación adicional. El posterior ensayo de los clones de ADNc 709.39.1 a 709.39.96 identificó el clon de ADNc n.º 18 reconocido por MLTC 1A.1 (C). Dianas: células 293T (20 000 células/pocillo), MA-MEL-86A (50 000 células/pocillo); linfocitos T: MLTC 1A.1 (10 000 linfocitos/pocillo); ADNc transfectados: ADNc de HLA (100 ng/pocillo); combinaciones de ADNc (300 ng/pocillo); ensayo ELISpot de 20h-IFN- $\gamma$ . La secuenciación del clon de ADNc n.º 709.39.18 y la búsqueda en Blast con las secuencias derivadas identificaron CSF2RA (la cadena alfa del receptor de GM-CSF) como antígeno reconocido. El ORF de 1831 pb del ADNc n.º 709.39.18 codifica el transcrito variante 2 del gen, cuya traducción produce la isoforma A de la proteína CSF2RA.

**Figura 4:** Respuestas de CTL 1A.1/506 reactivo a CSF2RA para diferentes células mieloides aisladas de capas

leucocitarias (BC) de donadores sanos. CTL 1A.1/506 (40 000 células/pocillo) se ensayó para el reconocimiento de monocitos, granulocitos y células dendríticas (DC) (50 000 células/pocillo), las últimas aisladas y diferenciadas *in vitro* a partir de PBMC de BC de cuatro donadores sanos diferentes. Las líneas de melanoma autólogas sirvieron como controles.

- 5 **Figura 5:** Reconocimiento de células de diversas especies después de transfección con CSF2RA por CTL 1A.1/506. Se transfectaron de forma transitoria células humanas (K562, 293T), de mono (COS-7) y de ovario de hámster chino (CHO) con CSF2RA y se ensayaron para el reconocimiento por CTL 1A.1/506 usando el ensayo ELISpot de IFN- $\gamma$ . Todas las reacciones se ensayaron por duplicado.
- 10 **Figura 6:** Reconocimiento del tumor por CTL 1A. 1/506 con y sin anticuerpos de bloqueo. CTL 1A. 1/506 (10 000 células/pocillo) se ensayó con un ensayo ELISpot de IFN- $\gamma$  para el reconocimiento de MA-MEL-86B (50 000 células/pocillo). Se aplicaron anticuerpos monoclonales (mAb) específicos para pan-HLA I, CD3 o CSF2RA para bloquear el reconocimiento. Únicamente los mAb que se unen a CSF2RA o el receptor de linfocitos T (CD3) inhibían la respuesta CTL.
- 15 **Figura 7:** Clonación del receptor de linfocitos T (TCR) de CTL 1A.1/506. Se hizo clonación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR de acuerdo con el protocolo publicado por Birkholz y col., (J Immunol Meth, 2009). Los clones de ADNc de TCR se secuenciaron y analizaron usando la base de datos IMGT/VQuest. Las cadenas beta de TCR están compuestas de segmentos V (variabilidad), D (diversidad) y J (unión), mientras que las cadenas alfa están compuestas de regiones V y J únicamente. CDR (regiones determinantes de complementariedad).
- 20 **Figura 8:** Reconocimiento de células de diversas especies después de transfección con TRP-2 por CTL 2C/417. Se transfectaron de forma transitoria células humanas (K562, 293T, L721.221), de mono (COS-7), de ratón (RMA/A2 n.º 7, P815-TK-) y de ovario de hámster chino (CHO) con TRP-2 y se ensayaron para el reconocimiento por CTL 2C/417 usando el ensayo ELISpot de IFN- $\gamma$ . Todas las reacciones se ensayaron por duplicado.
- 25 **Figura 9:** Detección de la expresión en superficie de TRP-2 por microscopia de barrido láser confocal. Se cultivaron células 293T transfectadas con plásmidos que codifican pEYFP-Mem unido a membrana (a) y TRP-2 humano en portaobjetos de microscopio. TRP-2 se detectó con un anticuerpo policlonal marcado con Alexa 564 contra TRP-2 (b). La imagen confocal 3D reveló que TRP-2 se detectaba como una proteína transmembranaria mediante su anticuerpo (c).
- 30 **Figura 10:** Detección de la expresión en superficie de TRP-2 por microscopia de barrido láser confocal usando una proteína de fusión TRP-2- $\alpha$ -BTX. El sitio de unión a  $\alpha$ -BTX de 13 aminoácidos de longitud se une a  $\alpha$ -bungarotoxina con alta afinidad. Se integró una secuencia que codifica el sitio de unión a  $\alpha$ - BTX en diferentes posiciones en la secuencia que codifica la parte extracelular de TRP-2 (A). Se cotransfectaron de forma transitoria células MA-MEL-86A, cultivadas en portaobjetos de microscopio, con un plásmido que codifica el reactivo de seguimiento de membrana celular pEYFP-Mem (a) y la proteína de fusión TRP-2/ $\alpha$ BTX. Después de la tinción con  $\alpha$ -bungarotoxina marcada de forma fluorescente (fluorescencia roja, b) y superponer las dos imágenes, la expresión en superficie celular de la proteína de fusión se volvió evidente (fluorescencia amarilla, c).
- 35 **Figura 11:** El reconocimiento de TRP-2 por CTL 2C/417 requiere que la proteína contenga un dominio transmembranario (TMD). Se transfectó el ADNc de TRP-2 de longitud completa (fl) o una variante de TRP-2 que carece de la secuencia codificante de TMD de la proteína (TMDdel) en células 293T y se ensayaron para el reconocimiento por CTL 2C/417 mediante el ensayo ELISpot de IFN- $\gamma$ . La variante de eliminación no se reconoció (A). Cuando la secuencia codificante de TMD original se reemplazaba por el TMD clonado del ADNc de HLA-A24 y esta variante de remplazo se transfectaba en comparación con el ADNc-fl de TRP-2 en células 293T, el CTL reconocía ambas variantes (B). Este resultado confirma adicionalmente que TRP-2 tiene que presentarse en la superficie celular para llegar a reconocerse por los linfocitos T. (C) Representación esquemática del TRP-2 recombinante que contiene el HLA-A24-TMD.
- 40 **Figura 12:** Clonación del receptor de linfocitos T (TCR) de CTL 2C/417. Se hizo clonación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR de acuerdo con el protocolo publicado por Birkholz y col., (J Immunol Meth, 2009). Los clones de ADNc de TCR se secuenciaron y analizaron usando la base de datos IMGT/VQuest. Las cadenas beta de TCR están compuestas de segmentos V (variabilidad), D (diversidad) y J (unión), mientras que las cadenas alfa están compuestas de regiones V y J únicamente. CDR (regiones determinantes de complementariedad).
- 45 **Figura 13:** Clonación, expresión y análisis de un TCR nativo y quimérico de CTL 1A.3/46.

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de CSF2RA:



MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEKSDLRTVAPASSLNVRFDSRTMNLSWDCQE  
NTTFSKCFLTDKKNRVVEPRLSNNECSCTFREICLHEGVTFEVHVNTSQRGFQ  
QKLLYPNSGREGTAAQNFSCFIYNADLMNCTWARGPTAPRDVQYFLYIRNSK  
RRREIRCPYYIQDSGTHVGCHLDNLSGLTSRNYFLVNGTSREIGIQFFDSLLDT  
KKIERFNPPSNVTVRCNTTHCLVRWKQPRTYQKLSYLDYQYQLDVHRKNTQP  
GTENLLINVSGDLENRYNFPSSSEPRAKHSVKIRAADVRLNWSSWSEAIEFGSD  
DGNLGSVYIYVLLIVGTLVCGIVLGFLEKRFRLRIQRLFPVPQIKDKLNDNHEV  
EDEIIEEFTPEEGKGYREEVLTVEIT

La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de TRP-2 (isoforma 1)

MSPLWWGFLLSCLGCKILPGAQQQFPRVCMTVDSL VNKECCPRLGAESANVC  
GSQQGRGQCTEVRADTRPWSGPYILRNQDDRELWPRKFFHRTCKCTGNFAGY  
NCGDCKFGWTGPNCERKKPPVIRQNIHSLSPQEREQFLGALDLAKKRVHPDY  
VITTQHWLGLLGPNGTQPQFANCSVYDFFVWLHYYSVRDILLGPRPYRAID  
FSHQGPAFVTWHRYHLLCLERDLQRLIGNESFALPYWNFATGRNECDVCTDQ  
LFGAARPDDPTLISRNSRFSSWETVCDLDDYNHLVTLNNGTYEGLLRNQM  
GRNSMKLPTLKDIRDCLSLQKFDNPPFFQNSTFSFRNALEGFDKADGTLDSQV  
MSLHNLVHSFLNGTNALPHSAANDPIFVVLHSFTDAIFDEWMKRFNPPADAW  
PQELAPIGHNRMYNMVPFFPPVTNEELFLTSDQLGYSY AIDL PVSVEETPGWPT  
TLLVVMGTLVALVGLFVLLAFLQYRRLRKGYPMLMETHLSSKRYTEEA

La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de cadena alfa de TCR de CTL 1A.1/506

METLLGPLILWLQLQWVSSKQEV TQIPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQ  
WFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQSGDSATY  
LCAVGGNDYKLSFGAGTTVTRANIQNSDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD  
SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI  
IPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTL  
RLWSS

La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de cadena beta de TCR del clon CTL 1A.1/506

MGTRLFFYVALCLLWTGHMDAGITQSPRHKVTETGTPVTLRCHQTENHRYM  
YWYRQDPGHGLRLIHYSYGKDTDKGEVSDGYSVSRSKTEDFLLTLESATSS  
QTSVYFCAISEKLAGAYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT  
QKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC  
LSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG  
RADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de cadena alfa de TCR del clon CTL 2C/417

MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSVAQPEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYL  
FWYVQYPNRGLQFLLKYITGDNLVKGSYGFEAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDS  
ALYFCAVRDMIEGGGNKLTFGTGTQLKVELNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV  
CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA  
NAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGF  
NLLMTLRLWSS

La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de cadena beta de TCR del clon CTL 2C/417

MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENM  
FWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTNQT  
SMYLCASSRQGAVGQPQHFQDGTLSILEDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQK  
ATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSS  
RLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA  
DCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

5 La SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de cadena alfa de TCR del clon CTL 1A3/46

MSLSSLLKVVTASLWLGPGIAQKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTS DPSYG  
LFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDQQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISASQLGD  
SAMYFCAMRPHFGNEKLTFGTGTRLTIIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLF  
TDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA  
FNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNL  
LMTLRLWSS

La SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de cadena beta de TCR del clon CTL 1A3/46

MGTRLFFYVALCLLWTGHMDAGITQSPRHKVTTETGTPVTLRCHQTENHRYM  
YWYRQDPGHGLRLIHYSYGVKDTDKGEVSDGYSVSRKTEDFLLTLESATSS  
QTSVYFCAISEKLAGAYEQYFGPGTRLTVTEDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHT  
QKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC  
LSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG  
RADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

\*

Las SEQ ID NO: 9 a 26 muestran las secuencias de CDR del TCR de la invención.

10 **Ejemplos**

**Ejemplo 1: Generación de linfocitos T CD8 positivos reactivos a melanoma**

Del paciente con melanoma MA-MEL-86, se establecieron cuatro líneas de células tumorales permanentes

diferentes (MA-MEL-86A, -86B, -86C, -86F) a partir de metástasis de ganglio linfático diferentes. Tanto MA-MEL-86B como MA-MEL-86F no expresaban HLA I en su superficie celular debido a la mutación bialélica en el gen de  $\beta$ 2-microglobulina. La línea de células tumorales MA-MEL-86C perdió un haplotipo de HLA. En contraste con esto, la línea MA-MEL-86A expresaba todo los alelos de HLA I, pero fue la única de las cuatro líneas de células tumorales que no mostraba expresión de antígenos de diferenciación de melanoma (figura 1).

Se generaron linfocitos T CD8 positivos reactivos a tumor en el llamado cultivo de células tumorales de linfocitos mixto (MLTC) por estimulación semanal de linfocitos recogidos de células mononucleares de sangre periférica, PBMC, con líneas de células tumorales autólogas MA-MEL-86A o MA-MEL-86C. Sorprendentemente, los autores de la presente invención reconocieron que los linfocitos sensibles de MLTC en patrones de reconocimiento variables aún reconocían las variantes HLA I negativas MA-MEL-86B (figura 2) y MA-MEL-86F. Esto se confirmó con linfocitos T clonales (CTL) de estos MLTC. Los MLTC y los clones de CTL se usaron para la identificación de sus moléculas diana.

**Ejemplo 2: Identificación de CSF2RA**

Se cribó una colección de ADNc de la línea celular de melanoma MEL-86A construida en el vector de expresión eucariótico pcDNA3.1 con los linfocitos sensibles de MLTC 1A.1. En una primera etapa, se cotransfectaron combinaciones de ADNc que consistían en 100 clones de ADNc con alelos de HLA I del paciente en células 293T. Los transfectantes se ensayaron para el reconocimiento por los linfocitos T. Se descubrió que una de las combinaciones era sensible. Posteriormente, se realizó una clonación de ADNc por etapas. De esta manera, se identificó CSF2RA como diana del MLTC 1A.1 (figura 3). Después, se aislaron clones de linfocitos T que podían detectar las variantes de células de melanoma HLA I negativas y que estaban dirigidas contra CSF2RA. En particular, cuando se observa la reactividad cruzada de los linfocitos T contra CSF2RA, se reconoce la particularidad del antígeno. Los linfocitos T reactivos a CSF2RA podían detectar un 60 % de las líneas celulares de melanoma disponibles, pero también líneas de células tumorales de páncreas, colon, pulmón, ovario, y de origen de vesícula biliar, así como leucemias mieloides (tabla 2).

**Tabla 2:** Líneas tumorales alogénicas reconocidas por el CTL 1A. 1/506 reactivo a CSF2RA.

Líneas tumorales analizadas	reconocimiento / n ensayado
<b>Melanomas</b>	12/20
<b>Carcinomas de páncreas (PC)</b>	2/2
<b>Carcinomas de riñón (RCC)</b>	0/5
<b>Leucemias mieloides agudas (AML)</b>	5/13
<b>Leucemias mielógenas crónicas (CML)</b>	0/11
<b>Carcinomas colorrectales (CRC)</b>	1/6
<b>Carcinomas pulmonares</b>	1/4
<b>Carcinoma de mama</b>	0/1
<b>Carcinoma de ovario</b>	1/1
<b>Carcinoma de vesícula biliar</b>	1/1
<b>Glioblastoma</b>	0/11

Por otro lado, todas las líneas celulares normales ensayadas, entre otras melanocitos, granulocitos y monocitos, derivadas de sangre periférica, no se reconocían por los linfocitos T reactivos a CSF2RA (véase la figura 4). La pureza de las preparaciones celulares se ensayó por anticipado mediante citometría de flujo. Además, posterior a una transfección con CSF2RA, podían detectarse líneas celulares de diferentes especies mediante los linfocitos T reactivos a CSF2RA (véase la figura 5). No fue necesaria una cotransfección con HLA I.

Usando citometría de flujo, los autores de la presente invención mostraron además que todos los linfocitos T reactivos a CSF2RA eran TCR $\alpha\beta$  positivos, CD3 positivos y CD8 positivos, y expresaban la cadena beta del receptor de linfocitos T V $\beta$ 12 (TRBV10-3). La reactividad de estos linfocitos T podían inhibirse únicamente por anticuerpos contra CD3 o CSF2RA, pero no con anticuerpos contra HLA I o II (véase la figura 6).

Los ADNc de la cadena alfa y la beta del TCR del clon de linfocitos T reactivo a CSF2RA independiente de HLA, 1A.1/506, se clonaron y secuenciaron (véase la figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4).

**Ejemplo 3: Identificación de TRP-2**

En el ensayo de panel, se transfectaron 40 clones de ADNc que codifican antígenos asociados a melanoma conocidos, en células 293T. Los transfectantes se ensayaron posteriormente para el reconocimiento por linfocitos sensibles de MLTC 1C y 2C. Se descubrió que tanto los MLTC como los clones CTL derivados de los mismos podían reconocer las líneas de células tumorales HLA I negativas MA-MEL-86B y -86F y estaban dirigidas al

antígeno de diferenciación de melanosomas TRP-2. Reaccionaban de forma cruzada con cualquiera de las líneas celulares de melanoma que expresan TRP-2 disponibles en el laboratorio, así como con melanocitos normales y, después de transfección con TRP-2, también con células no melanocíticas de origen de ratón, de hámster y de mono (véase la figura 8). No fue necesaria una cotransfección de moléculas HLA I. Los linfocitos T reactivos a TRP-2 independientes de HLA reconocían también células de melanoma murinas y TRP-2 murino después de la transfección.

Usando citometría de flujo, los autores de la presente invención mostraron además que todos los linfocitos T reactivos a TRP-2 eran TCR $\alpha\beta$  positivos, CD3 positivos y CD8 positivos, y expresaban la cadena beta del receptor de linfocitos T V $\beta$ 3 (TRBV28). La reactividad de estos linfocitos T podían inhibirse únicamente por anticuerpos contra CD3, pero no por anticuerpos contra HLA I o II.

El reconocimiento directo de TRP-2 por linfocitos T CD8 positivos requeriría la expresión en superficie celular del antígeno. De hecho, los autores de la presente invención pudieron mostrar la expresión en la superficie celular con un anticuerpo reactivo a TRP-2 (véase la figura 9). Para una evidencia inequívoca de TRP-2 en la superficie de células de melanoma humanas, los autores de la presente invención usaron tecnología de ADN recombinante para modificar TRP-2 con un sitio de reconocimiento de alfa-bungarotoxina de 13 aminoácido de longitud. Este sitio puede unirse a la neurotoxina alfa-BTX con alta afinidad y especificidad. Usando alfa-BTX acoplada a un fluorocromo, llegó a ser posible la visualización de la proteína de fusión de TRP-2 en la superficie celular de los transfectantes (véase la figura 10).

Este resultado se vio confirmado por el hallazgo de que una eliminación del dominio transmembranario (TMD) de TRP-2 provocaba una pérdida del reconocimiento por los linfocitos T, que podía invertirse mediante la sustitución con un TMD no relacionado de HLA-A\*24:01 (véase la figura 11).

Los ADNc de la cadena alfa y la beta del TCR del clon de linfocitos T reactivos a TRP-2 independientes de HLA, 2C/417, se clonaron y se ensayó su función mediante transferencia a linfocitos T CD8 positivos de PBMC de un donador sano (SEQ ID NO: 5 y 6; figura 12).

#### **Ejemplo 4: Clonación, expresión ectópica y análisis funcional de un segundo receptor de linfocitos T a/b específico de CSF2RA.**

Se aislaron los ADNc de la cadena a y b del receptor de linfocitos T (TCR) aislados del CTL 1A.3/46 específico de CSF2RA y se clonaron como una construcción bicistrónica en un vector retroviral (figura 13A). Posteriormente, los dominios constantes humanos se remplazaron por dominios constantes de TCR murinos ("quiméricos" o "murinizados") para minimizar el emparejamiento de cadenas de TCR transducidas con endógenas después de la expresión ectópica en linfocitos T humanos.

La expresión en superficie celular del TCR específico de CSF2RA en linfocitos T humanos transducidos con las construcciones nativas (izquierda) y quiméricas (derecha) se muestra en la figura 13B. El porcentaje de linfocitos T TCR-V $\beta$ 12-positivos en PBMC no transducidas en esta muestra fue < 3 % (no mostrado).

En un análisis de respuestas del CTL 1A.3/44 reactivo a CSF2RA en comparación con linfocitos T alogénicos transducidos con CSF2RA-TCR, no se reconocieron células diana CSF2RA negativas (MA-MEL-86F y 293T) mientras que se reconocieron células MA-MEL-86B que expresan CSF2RA de forma endógena y células 293T transfectadas con el antígeno (figura 13C). Los linfocitos T transducidos con el TCR quimérico mostraron una respuesta comparable a la del CTL 1A.3/44 reactivo a CSF2RA y reactividad significativamente mayor que los linfocitos T transducidos con la construcción de TCR "nativa".

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Johannes Gutenberg-Universität Mainz

<120> Antígenos asociados a tumor independientes de MHC novedosos

<130> U30451WO

<150> EP12197289.7

<151> 14/12/2012

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 721 159 T3

<400> 1

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro  
20 25 30

Ala Ser Ser Leu Asn Val Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser  
35 40 45

Trp Asp Cys Gln Glu Asn Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp  
50 55 60

Lys Lys Asn Arg Val Val Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser  
65 70 75 80

Cys Thr Phe Arg Glu Ile Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val  
85 90 95

His Val Asn Thr Ser Gln Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro  
100 105 110

Asn Ser Gly Arg Glu Gly Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile  
115 120 125

Tyr Asn Ala Asp Leu Met Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala  
130 135 140

Pro Arg Asp Val Gln Tyr Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg  
145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Cys Pro Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val

ES 2 721 159 T3

				165						170						175
Gly	Cys	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Arg	Asn	Tyr	Phe	
			180					185					190			
Leu	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Arg	Glu	Ile	Gly	Ile	Gln	Phe	Phe	Asp	Ser	
		195					200					205				
Leu	Leu	Asp	Thr	Lys	Lys	Ile	Glu	Arg	Phe	Asn	Pro	Pro	Ser	Asn	Val	
	210					215					220					
Thr	Val	Arg	Cys	Asn	Thr	Thr	His	Cys	Leu	Val	Arg	Trp	Lys	Gln	Pro	
225					230					235					240	
Arg	Thr	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ser	Tyr	Leu	Asp	Phe	Gln	Tyr	Gln	Leu	Asp	
				245					250					255		
Val	His	Arg	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Gly	Thr	Glu	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	
			260					265					270			
Val	Ser	Gly	Asp	Leu	Glu	Asn	Arg	Tyr	Asn	Phe	Pro	Ser	Ser	Glu	Pro	
		275					280					285				
Arg	Ala	Lys	His	Ser	Val	Lys	Ile	Arg	Ala	Ala	Asp	Val	Arg	Ile	Leu	
	290					295					300					
Asn	Trp	Ser	Ser	Trp	Ser	Glu	Ala	Ile	Glu	Phe	Gly	Ser	Asp	Asp	Gly	
305					310					315					320	
Asn	Leu	Gly	Ser	Val	Tyr	Ile	Tyr	Val	Leu	Leu	Ile	Val	Gly	Thr	Leu	
				325					330					335		
Val	Cys	Gly	Ile	Val	Leu	Gly	Phe	Leu	Phe	Lys	Arg	Phe	Leu	Arg	Ile	
			340					345					350			
Gln	Arg	Leu	Phe	Pro	Pro	Val	Pro	Gln	Ile	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn	Asp	
		355					360					365				
Asn	His	Glu	Val	Glu	Asp	Glu	Ile	Ile	Trp	Glu	Glu	Phe	Thr	Pro	Glu	
	370					375					380					
Glu	Gly	Lys	Gly	Tyr	Arg	Glu	Glu	Val	Leu	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	
385					390					395					400	

<210> 2  
 <211> 519  
 <212> PRT

ES 2 721 159 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Pro Leu Trp Trp Gly Phe Leu Leu Ser Cys Leu Gly Cys Lys  
 1 5 10 15

Ile Leu Pro Gly Ala Gln Gly Gln Phe Pro Arg Val Cys Met Thr Val  
 20 25 30

Asp Ser Leu Val Asn Lys Glu Cys Cys Pro Arg Leu Gly Ala Glu Ser  
 35 40 45

Ala Asn Val Cys Gly Ser Gln Gln Gly Arg Gly Gln Cys Thr Glu Val  
 50 55 60

Arg Ala Asp Thr Arg Pro Trp Ser Gly Pro Tyr Ile Leu Arg Asn Gln  
 65 70 75 80

Asp Asp Arg Glu Leu Trp Pro Arg Lys Phe Phe His Arg Thr Cys Lys  
 85 90 95

Cys Thr Gly Asn Phe Ala Gly Tyr Asn Cys Gly Asp Cys Lys Phe Gly  
 100 105 110

Trp Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Lys Lys Pro Pro Val Ile Arg Gln  
 115 120 125

Asn Ile His Ser Leu Ser Pro Gln Glu Arg Glu Gln Phe Leu Gly Ala  
 130 135 140

Leu Asp Leu Ala Lys Lys Arg Val His Pro Asp Tyr Val Ile Thr Thr  
 145 150 155 160

Gln His Trp Leu Gly Leu Leu Gly Pro Asn Gly Thr Gln Pro Gln Phe  
 165 170 175

Ala Asn Cys Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu His Tyr Tyr Ser  
 180 185 190

Val Arg Asp Thr Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg Ala Ile Asp  
 195 200 205

Phe Ser His Gln Gly Pro Ala Phe Val Thr Trp His Arg Tyr His Leu  
 210 215 220

Leu Cys Leu Glu Arg Asp Leu Gln Arg Leu Ile Gly Asn Glu Ser Phe  
 225 230 235 240

ES 2 721 159 T3

Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Phe Ala Thr Gly Arg Asn Glu Cys Asp Val  
 245 250 255

Cys Thr Asp Gln Leu Phe Gly Ala Ala Arg Pro Asp Asp Pro Thr Leu  
 260 265 270

Ile Ser Arg Asn Ser Arg Phe Ser Ser Trp Glu Thr Val Cys Asp Ser  
 275 280 285

Leu Asp Asp Tyr Asn His Leu Val Thr Leu Cys Asn Gly Thr Tyr Glu  
 290 295 300

Gly Leu Leu Arg Arg Asn Gln Met Gly Arg Asn Ser Met Lys Leu Pro  
 305 310 315 320

Thr Leu Lys Asp Ile Arg Asp Cys Leu Ser Leu Gln Lys Phe Asp Asn  
 325 330 335

Pro Pro Phe Phe Gln Asn Ser Thr Phe Ser Phe Arg Asn Ala Leu Glu  
 340 345 350

Gly Phe Asp Lys Ala Asp Gly Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Ser Leu  
 355 360 365

His Asn Leu Val His Ser Phe Leu Asn Gly Thr Asn Ala Leu Pro His  
 370 375 380

Ser Ala Ala Asn Asp Pro Ile Phe Val Val Leu His Ser Phe Thr Asp  
 385 390 395 400

Ala Ile Phe Asp Glu Trp Met Lys Arg Phe Asn Pro Pro Ala Asp Ala  
 405 410 415

Trp Pro Gln Glu Leu Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Met Tyr Asn Met  
 420 425 430

Val Pro Phe Phe Pro Pro Val Thr Asn Glu Glu Leu Phe Leu Thr Ser  
 435 440 445

Asp Gln Leu Gly Tyr Ser Tyr Ala Ile Asp Leu Pro Val Ser Val Glu  
 450 455 460

Glu Thr Pro Gly Trp Pro Thr Thr Leu Leu Val Val Met Gly Thr Leu  
 465 470 475 480

Val Ala Leu Val Gly Leu Phe Val Leu Leu Ala Phe Leu Gln Tyr Arg  
 485 490 495



ES 2 721 159 T3

Arg Leu Arg Lys Gly Tyr Thr Pro Leu Met Glu Thr His Leu Ser Ser  
 500 505 510

Lys Arg Tyr Thr Glu Glu Ala  
 515

<210> 3  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

5

Met Glu Thr Leu Leu Gly Pro Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp  
 1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val  
 20 25 30

Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala  
 35 40 45

Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr  
 50 55 60

Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg  
 65 70 75 80

Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile  
 85 90 95

Ala Ala Ser Gln Ser Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gly  
 100 105 110

Gly Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val  
 115 120 125

Arg Ala Asn Ile Gln Asn Ser Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp  
 130 135 140

Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser  
 145 150 155 160

Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp  
 165 170 175

Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala  
 180 185 190

ES 2 721 159 T3

Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn  
 195 200 205

Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 210 215 220

Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu  
 225 230 235 240

Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys  
 245 250 255

Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 260 265 270

<210> 4  
 <211> 312  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

5

Met Gly Thr Arg Leu Phe Phe Tyr Val Ala Leu Cys Leu Leu Trp Thr  
 1 5 10 15

Gly His Met Asp Ala Gly Ile Thr Gln Ser Pro Arg His Lys Val Thr  
 20 25 30

Glu Thr Gly Thr Pro Val Thr Leu Arg Cys His Gln Thr Glu Asn His  
 35 40 45

Arg Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly His Gly Leu Arg Leu  
 50 55 60

Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Lys Asp Thr Asp Lys Gly Glu Val Ser  
 65 70 75 80

Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Ser Lys Thr Glu Asp Phe Leu Leu Thr  
 85 90 95

Leu Glu Ser Ala Thr Ser Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ile  
 100 105 110

Ser Glu Lys Leu Ala Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr  
 115 120 125

Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val  
 130 135 140

ES 2 721 159 T3

Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala  
145 150 155 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu  
165 170 175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp  
180 185 190

Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys  
195 200 205

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg  
210 215 220

Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp  
225 230 235 240

Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala  
245 250 255

Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln  
260 265 270

Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys  
275 280 285

Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met  
290 295 300

Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
305 310

<210> 5  
<211> 276  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 5

Met Ala Ser Ala Pro Ile Ser Met Leu Ala Met Leu Phe Thr Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Leu Arg Ala Gln Ser Val Ala Gln Pro Glu Asp Gln Val Asn Val  
20 25 30

Ala Glu Gly Asn Pro Leu Thr Val Lys Cys Thr Tyr Ser Val Ser Gly  
35 40 45

ES 2 721 159 T3

Asn Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Asn Arg Gly Leu Gln  
 50 55 60

Phe Leu Leu Lys Tyr Ile Thr Gly Asp Asn Leu Val Lys Gly Ser Tyr  
 65 70 75 80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Asn Lys Ser Gln Thr Ser Phe His Leu Lys  
 85 90 95

Lys Pro Ser Ala Leu Val Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Val  
 100 105 110

Arg Asp Met Ile Glu Gly Gly Gly Asn Lys Leu Thr Phe Gly Thr Gly  
 115 120 125

Thr Gln Leu Lys Val Glu Leu Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val  
 130 135 140

Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe  
 145 150 155 160

Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp  
 165 170 175

Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe  
 180 185 190

Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys  
 195 200 205

Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro  
 210 215 220

Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu  
 225 230 235 240

Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg  
 245 250 255

Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg  
 260 265 270

Leu Trp Ser Ser  
 275

<210> 6  
 <211> 310

ES 2 721 159 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val  
 1 5 10 15

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
 20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
 35 40 45

Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu  
 50 55 60

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
 65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
 85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
 100 105 110

Ser Arg Gln Gly Ala Val Gly Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr  
 115 120 125

Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val  
 130 135 140

Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala  
 145 150 155 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu  
 165 170 175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp  
 180 185 190

Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys  
 195 200 205

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg  
 210 215 220

Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp  
 225 230 235 240

ES 2 721 159 T3

Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala  
 245 250 255

Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln  
 260 265 270

Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys  
 275 280 285

Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met  
 290 295 300

Val Lys Arg Lys Asp Phe  
 305 310

<210> 7  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

5

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu  
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe  
 20 25 30

Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser  
 35 40 45

Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu  
 50 55 60

Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Gln Gln Asn Ala Thr  
 65 70 75 80

Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn  
 85 90 95

Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys  
 100 105 110

Ala Met Arg Pro His Phe Gly Asn Glu Lys Leu Thr Phe Gly Thr Gly  
 115 120 125

Thr Arg Leu Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val  
 130 135 140

ES 2 721 159 T3

Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe  
145 150 155 160

Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp  
165 170 175

Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe  
180 185 190

Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys  
195 200 205

Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro  
210 215 220

Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu  
225 230 235 240

Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg  
245 250 255

Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg  
260 265 270

Leu Trp Ser Ser  
275

<210> 8  
<211> 312  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 8

Met Gly Thr Arg Leu Phe Phe Tyr Val Ala Leu Cys Leu Leu Trp Thr  
1 5 10 15

Gly His Met Asp Ala Gly Ile Thr Gln Ser Pro Arg His Lys Val Thr  
20 25 30

Glu Thr Gly Thr Pro Val Thr Leu Arg Cys His Gln Thr Glu Asn His  
35 40 45

Arg Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly His Gly Leu Arg Leu  
50 55 60

Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Lys Asp Thr Asp Lys Gly Glu Val Ser  
65 70 75 80

ES 2 721 159 T3

Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Ser Lys Thr Glu Asp Phe Leu Leu Thr  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Thr Ser Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ile  
100 105 110

Ser Glu Lys Leu Ala Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr  
115 120 125

Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val  
130 135 140

Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala  
145 150 155 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu  
165 170 175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp  
180 185 190

Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys  
195 200 205

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg  
210 215 220

Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp  
225 230 235 240

Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala  
245 250 255

Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln  
260 265 270

Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys  
275 280 285

Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met  
290 295 300

Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
305 310

<210> 9  
<211> 6



ES 2 721 159 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 9

Asp Ser Ala Ile Tyr Asn  
1 5

5 <210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 10

Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu  
1 5

10 <210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15 <400> 11

Cys Ala Val Gly Gly Asn Asp Tyr Lys Leu Ser  
1 5 10

20 <210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 12

Glu Asn His Arg Tyr  
1 5

25 <210> 13  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 13

Ser Tyr Gly Val Lys Asp  
1 5

30 <210> 14  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 14

Cys Ala Ile Ser Glu Lys Leu Ala Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr  
1 5 10

35 <210> 15  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 15

ES 2 721 159 T3

Val Ser Gly Asn Pro Tyr  
1 5

5 <210> 16  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 16

Tyr Ile Thr Gly Asp Asn Leu Val  
1 5

10 <210> 17  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 17

Cys Ala Val Arg Asp Met Ile Glu Gly Gly Gly Asn Lys Leu Thr  
1 5 10 15

15 <210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 18

Met Asp His Glu Asn  
1 5

20 <210> 19  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 19

Ser Tyr Asp Val Lys Met  
1 5

25 <210> 20  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
30 <400> 20

Cys Ala Ser Ser Arg Gln Gly Ala Val Gly Gln Pro Gln His  
1 5 10

35 <210> 21  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 21

Thr Ser Asp Pro Ser Tyr Gly  
1 5

ES 2 721 159 T3

<210> 22  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5 <400> 22

Gln Gly Ser Tyr Asp Gln Gln Asn  
1 5

<210> 23  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 23

Cys Ala Met Arg Pro His Phe Gly Asn Glu Lys Leu Thr  
1 5 10

<210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15 <400> 24

Glu Asn His Arg Tyr  
1 5

<210> 25  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 25

Ser Tyr Gly Val Lys Asp  
1 5

<210> 26  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 26

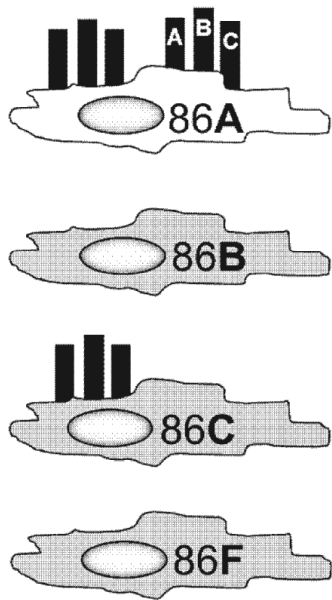
Cys Ala Ile Ser Glu Lys Leu Ala Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr  
1 5 10

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa del receptor de GM-CSF (CSF2RA) (SEQ ID NO: 1) para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad tumoral, en el que el tumor está desprovisto de un complejo de MHC de clase I funcional y muestra escape inmunitario por alteración del complejo de presentación de MHC de clase I, en el que dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido puede inducir una respuesta de linfocitos T y/o unirse a un receptor de linfocitos T equivalente, y en el que el tumor expresa CSF2RA (SEQ ID NO: 1) o una proteína que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con CSF2RA.
- 10 2. La proteína, fragmento de proteína o polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que puede inducir una respuesta de linfocitos T independiente de MHC de clase I o una respuesta de linfocitos T independiente de MHC de clase I y II.
3. La proteína, fragmento de proteína o polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el tumor es un tumor de la piel, preferentemente un melanoma.
- 15 4. Una molécula de ácido nucleico aislada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que codifica una proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.
- 20 6. Una célula para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, o un vector de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Un uso *in vitro* de una proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un vector de acuerdo con la reivindicación 5, una célula de acuerdo con la reivindicación 6, en el diagnóstico de una enfermedad tumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 25 8. Un agente de unión que es una cadena alfa del receptor de linfocitos T, o un fragmento de unión de la misma, que comprende todas de las SEQ ID NO: 9 a 11, o todas de las SEQ ID NO: 21 a 23.
9. Un agente de unión que es una cadena beta del receptor de linfocitos T, o un fragmento de unión de la misma, que comprende todas de las SEQ ID NO: 12 a 14, o todas de las SEQ ID NO: 24 a 26.
- 30 10. El agente de unión de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o 7.
11. El agente de unión de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 u 8.
- 35 12. El agente de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que es un receptor de linfocitos T, o un fragmento de unión del mismo, que comprende una región variable de cadena alfa que comprende todas de las SEQ ID NO: 9 a 11 y una región variable de cadena beta que comprende todas de las SEQ ID NO: 12 a 14; o una región variable de cadena alfa que comprende todas de las SEQ ID NO: 21 a 23 y una región variable de cadena beta que comprende todas de las SEQ ID NO: 24 a 26.
- 40 13. El agente de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que es un receptor quimérico de linfocitos T que comprende una región constante murinizada y una región variable humana.
- 45 14. Un linfocito T aislado, que comprende un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende un agente de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 que se une a una proteína, fragmento de proteína o polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y en el que dicha unión es independiente de la presentación de dicho polipéptido por MHC de clase I o MHC de clase I y II.

Figura 1:



MEL	HLA-A	HLA-B	HLA-C
MEL-86A	-A*01:01 -A*24:02	-B*08:01 -B*15:01	-C*07:01 -C*03:03
MEL-86B	-	-	-
MEL-86C	-A*01:01	-B*08:01	-C*07:01
MEL-86F	-	-	-


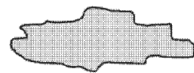
 : negativo para antígenos de melanoma  
 : positivo para antígenos de melanoma

Figura 2:

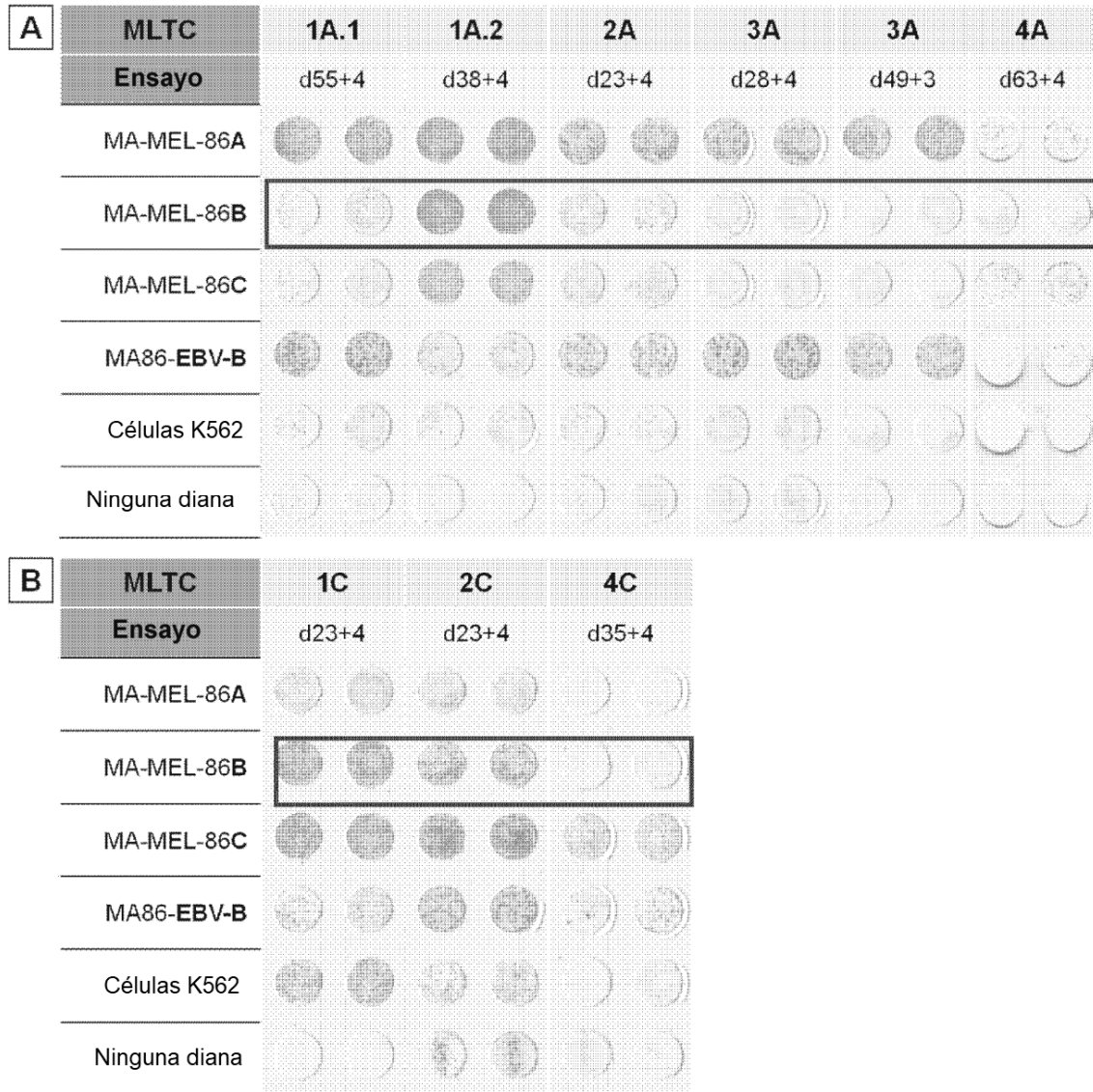


Figura 3:

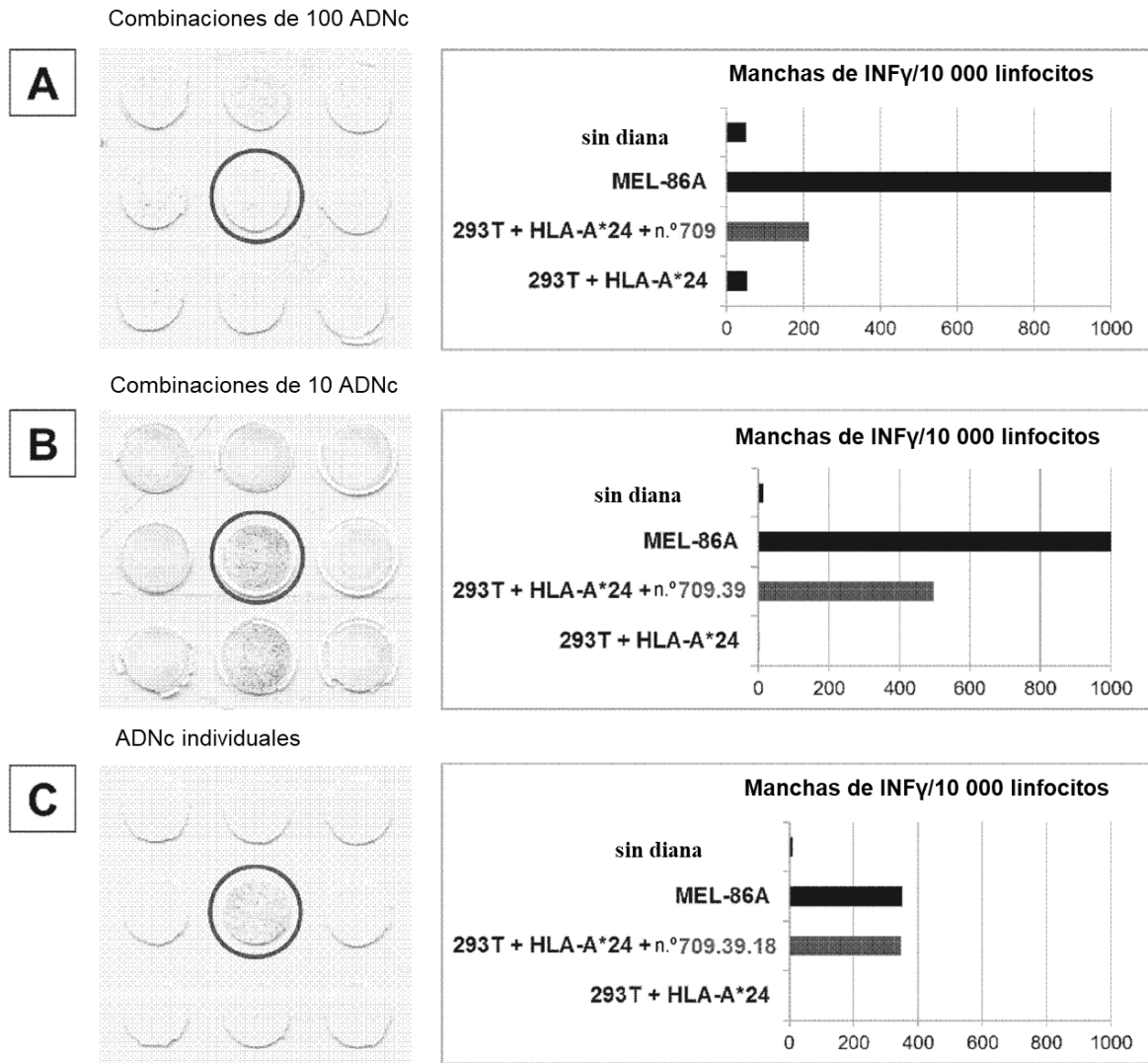


Figura 4:


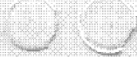









Número de donador Concentrados de leucocitos	Células diana	1A.1/506
BC 1102546	FastDC	
	monocitos	
BC 1102547	FastDC	
	monocitos	
BC 1102549	FastDC	
	monocitos	
BC 1103394	granulocitos	
-	-	
-	MA-MEL-86A	
-	MA-MEL-86B	
-	MA-MEL-86C	



Figura 5:

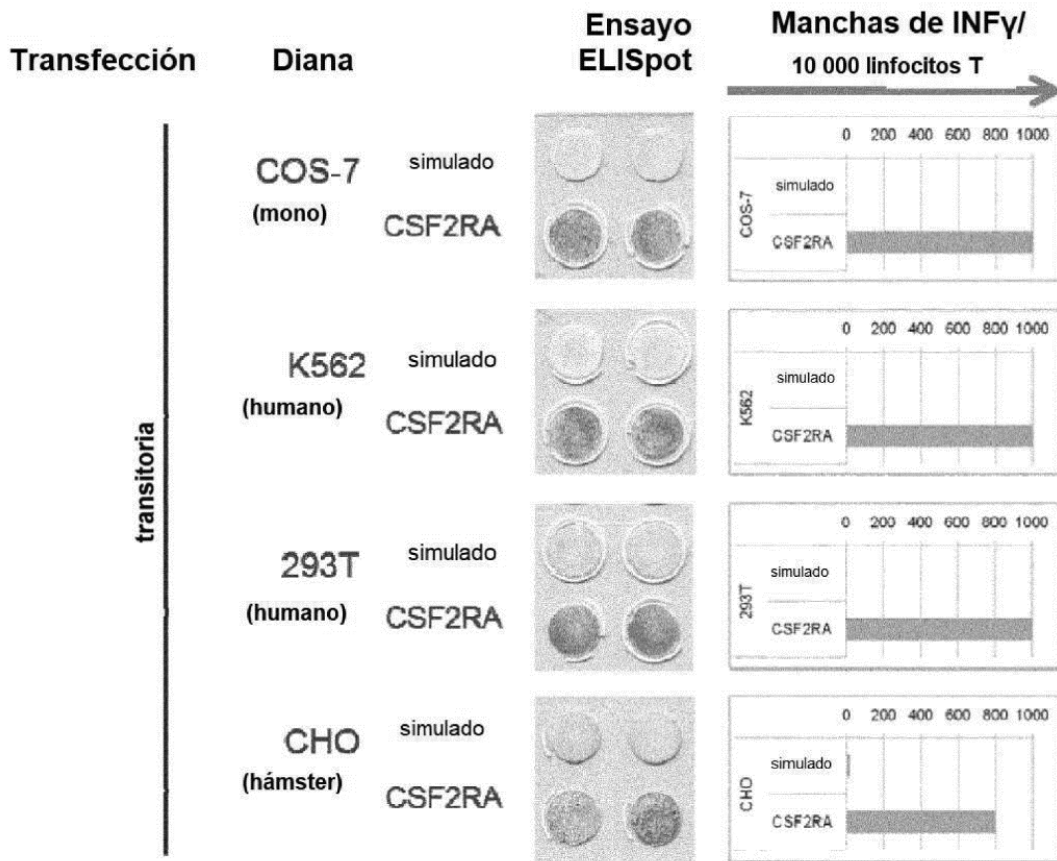


Figura 6:

Anticuerpo contra	MA-MEL-86B	1A.1/506
-	+	
HLA de clase I	+	
CD3	+	
HLA de clase I	+	
CSF2RA	+	

Figura 7:

	Elemento V	CDR1	CDR2	CDR3	Elemento J
1A.1/506 (reconocimiento de CSF2RA independiente de HLA)	cadena $\alpha$	TRAV21*02	DSAIYN	IQSSQRE CA	VGGNDYKLS FG TRAJ20*01
	cadena $\beta$	TRBV10-3*01	ENHRY	SYGVKD CA	ISEKLAGAYEQY FG TRBJ2-7*01

Figura 8:

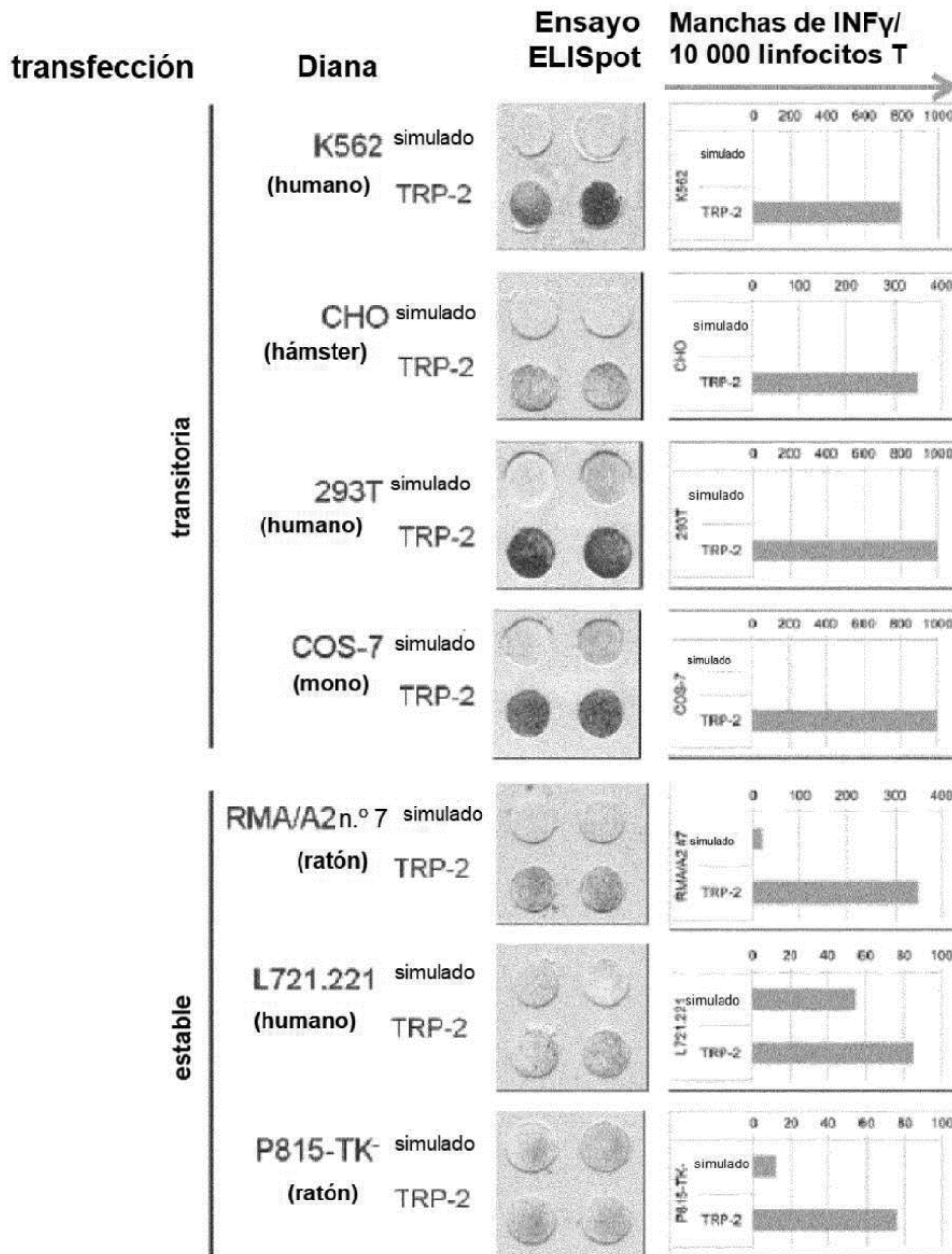


Figura 9:

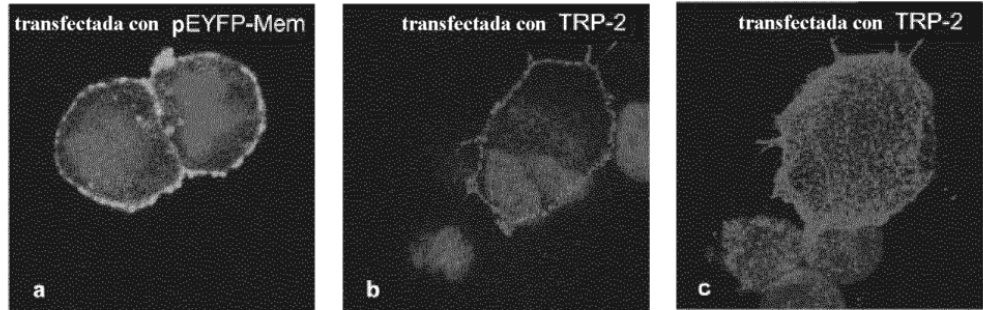


Figura 10:

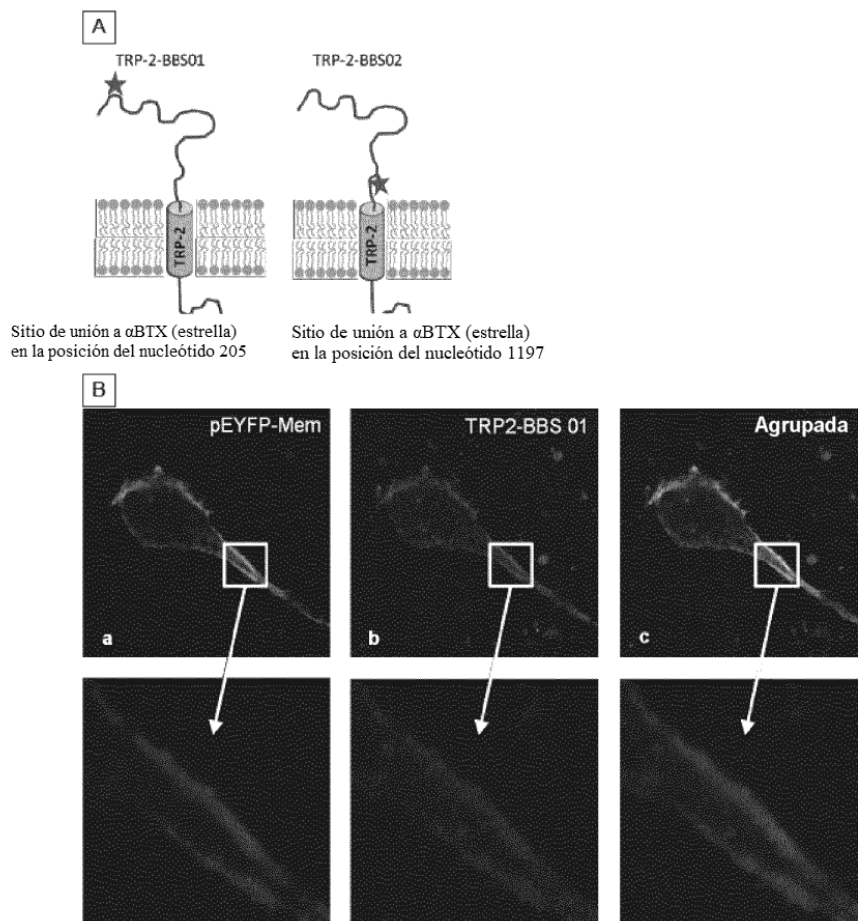


Figura 11:

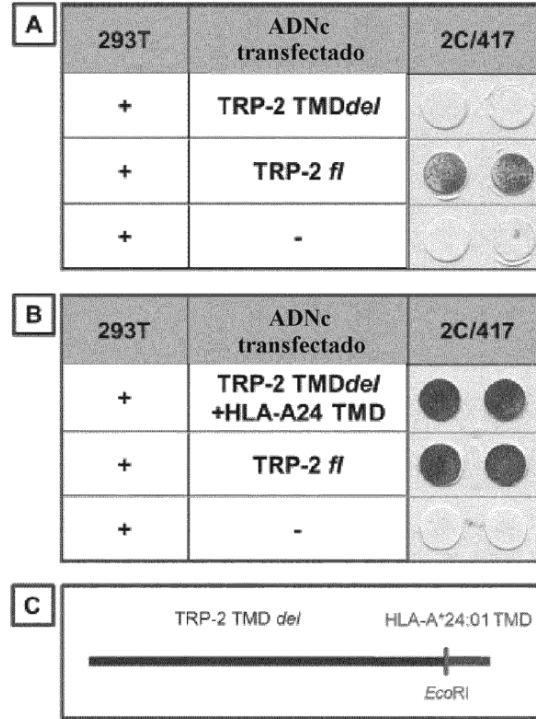


Figura 12:

	Elemento V	CDR1	CDR2	CDR3	Elemento J
<b>2C/417</b> (Reconocimiento de TRP2 independiente de HLA)	cadena $\alpha$	TRAV3*01	VSGNPY	YITGDNLV	CA VRDMIEGGGNKLT FG TRAJ10*01
	cadena $\beta$	TRBV28*01	MDHEN	SYDVKM	CAS SRQGAVGQPQH FG TRBJ1-5*01

Figura 13 A:

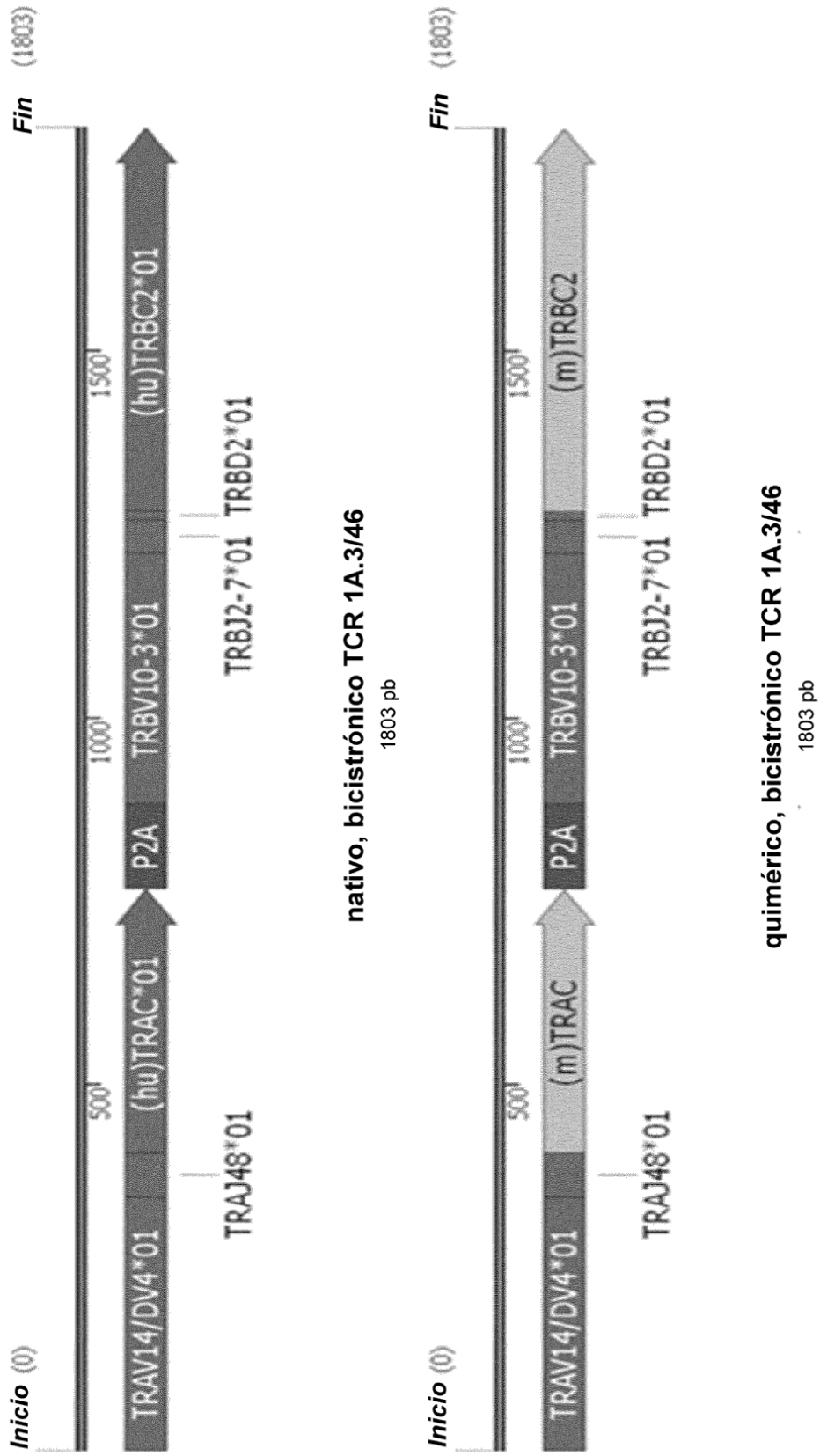
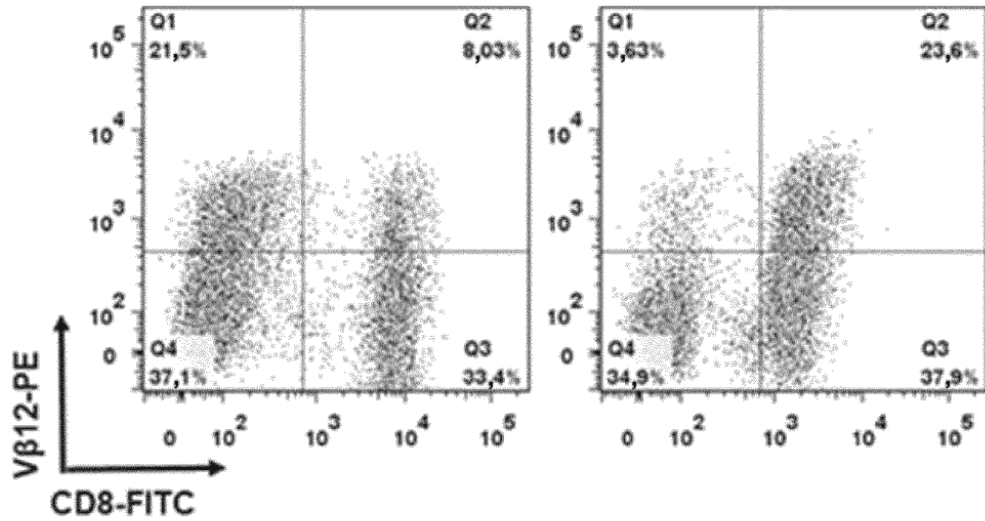


Figura 13 B y C:

**B**



**C**

