

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 367**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C12N 5/0783** (2010.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2012 PCT/IB2012/001318**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13175258**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2012 E 12761797 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2852612**

54 Título: **Nuevo péptido antigénico de melanoma y usos del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.03.2020**

73 Titular/es:  
**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%)**  
**101, rue de Tolbiac**  
**75013 Paris , FR;**  
**UNIVERSITE DE NANTES (25.0%);**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (25.0%) y**  
**UNIVERSITÉ D'ANGERS (25.0%)**

72 Inventor/es:  
**LABARRIERE, NATHALIE;**  
**LANG, FRANÇOIS;**  
**BOBINET, MATHILDE y**  
**ROGEL, ANNE**

74 Agente/Representante:  
**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 750 367 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 antigénico de melanoma y usos del mismo

**5 Sector de la técnica**

La presente invención describe un péptido antigénico de melanoma que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 o una variante conservadora de la función del mismo. Además, la invención también se refiere a un péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la invención para su uso en la prevención o el tratamiento del melanoma en un paciente.

**Estado de la técnica**

En las respuestas inmunitarias antineoplásicas, los linfocitos T citotóxicos (CTL, de sus siglas en inglés) CD8 se han identificado como las células efectoras más potentes (Vesely MD et al., 2011). Como consecuencia, la mayoría de las vacunas contra el cáncer anteriores usan péptidos restringidos por HLA de clase I procedentes de antígenos tumorales para estimular las respuestas de CTL. Sin embargo, el impacto clínico de las vacunas contra el cáncer basadas en péptidos sigue siendo modesto, incluso cuando se demostró que una vacuna del péptido procedente de gp100 reciente aumenta la supervivencia del paciente con melanoma (Rosenberg SA et al., 2004 y Schwartzentruber DJ et al., 2011). Además de una variedad de mecanismos inmunosupresores que se originan a partir del tumor en sí, el diseño subóptimo de las vacunas utilizadas hasta ahora puede explicar esta falla. En particular, los péptidos epitópicos cortos, podrían inducir respuestas de CTL que desaparecen o tolerancia hacia los antígenos diana (Bijker MS et al., 2007 y Toes RE et al., 1996). Mientras tanto, los linfocitos T auxiliares CD4 han ganado interés en la inmunidad antineoplásica y la inmunoterapia. De hecho, los linfocitos T CD4+ T auxiliares 1 (Th1) reactivos a tumores producen varias citocinas (tales como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2) esenciales para la inducción de inmunidad celular contra tumores. Un modelo ampliamente aceptado demuestra la capacidad de los linfocitos T CD4+ de "autorizar" a células dendríticas (CD) para la sensibilización eficaz de linfocitos T CD8+ a través de la interacción de receptores coestimuladores (Bennett SR et al., 1998 y Smith CM et al., 2004). Las citocinas secretadas por los linfocitos CD4+ Th1 también ejercen efectos antineoplásicos y antiangiogénicos directos. Además, se ha demostrado en un modelo de ratón que se ha encontrado que solo los linfocitos T CD4+ reactivos al tumor aseguran el reclutamiento eficaz de CTL efectoras en el sitio del tumor. Desde un punto de vista clínico, se ha demostrado recientemente una alta densidad de linfocitos CD4+ Th1 infiltrantes de tumores como un buen marcador de pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal, haciendo hincapié en el papel de estas células en la inmunovigilancia del cáncer. En el melanoma, los linfocitos T CD4 reactivos a tumores también se han asociado con un buen resultado clínico (Robbins PF et al., 2002), y, más recientemente, el mismo grupo mostró que los linfocitos T CD4 específicos de tumor estaban presentes en al menos un 20 % de las metástasis de melanomas, y sugirió que la infusión de poblaciones TIL que contienen linfocitos T CD4 específicos podría mejorar la eficacia de la terapia celular adoptiva (Friedman KM et al., 2012). En la misma línea de pensamiento, se ha demostrado en un paciente con melanoma que la transferencia celular adoptiva de linfocitos T CD4 específicos para el antígeno NYESO-1 induce una remisión clínica duradera y conduce a respuestas endógenas contra antígenos tumorales no dirigidos, lo que sugiere la estimulación de respuestas inmunitarias por linfocitos T CD4 transferidos (Hunder NN et al., 2008).

En el campo de la vacunación peptídica, se ha documentado hace veinte años, en un modelo de ratón, que la generación de una respuesta CD8 fuerte contra un péptido procedente de LCMV dependía de la presencia de linfocitos T auxiliares CD4 (Fayolle C et al., 1991). Estos resultados se han confirmado más recientemente en un entorno clínico mediante el uso de péptidos largos sintéticos (SLP, de sus siglas en inglés) en cáncer colorrectal, utilizando SLP procedentes de P53 (Speetjens FM et al., 2009), en neoplasia intraepitelial vulvar (Kenter GG et al., 2009) y pacientes con cáncer de cuello uterino (Welters MJ et al., 2008) utilizando SLP procedentes de HPV16. En el caso de la neoplasia vulvar, las respuestas clínicas parecían estar correlacionadas con la inducción de fuertes respuestas inmunitarias específicas de VPH16. Los péptidos largos sintéticos que contienen epítomos tumorales inmunogénicos CD8 y CD4 son, por lo tanto, herramientas atractivas para implementar una vacuna terapéutica contra el cáncer.

Uno de los principales problemas en el campo de la vacunación con péptidos largos en tumores sólidos es identificar péptidos largos inmunogénicos procedentes de antígenos asociados a tumores relevantes. Los antígenos diana deben expresarse ampliamente y ser capaces de inducir respuestas de linfocitos T CD8 y CD4 antineoplásicas consistentes. En el melanoma, el antígeno Melan-A cumple con estos requisitos y los inventores informaron recientemente sobre la eficacia de un SLP modificado de Melan-A, para cebar de forma cruzada linfocitos T reactivos a tumores humanos (Chauvin JM et al., 2012). Otra diana atractiva para la vacunación contra el melanoma sería el antígeno MELOE-1 (46 aminoácidos), específicamente sobreexpresado en el melanoma. De hecho, los inventores informaron previamente que la infusión de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL, de sus siglas en inglés) específicos para el antígeno MELOE-1 se asoció con una supervivencia prolongada sin recaídas para pacientes con melanoma HLA-A2 que recibieron terapia TIL (Godet Y et al., 2008). Además, se documentó la presencia de un gran repertorio de linfocitos T CD8 reactivos a tumores en pacientes con melanoma HLA-A2 (Godet Y et al., 2010) y la presencia de dos epítomos de clase II en la proximidad del epítomo de clase I, ubicado en el extremo C terminal del

polipéptido (Rogel A et al., 2011).

A pesar de estos resultados, la identificación de antígenos de melanoma adicionales con un potencial inmunogénico documentado sigue siendo un problema importante para abordar la inmunoterapia contra el melanoma.

5

**Objeto de la invención**

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

10 En este estudio, los inventores encuentran nuevos epítomos ubicados a lo largo de la secuencia MELOE-1 y caracterizados por su perfil de T auxiliares de la respuesta de linfocitos T CD4.

15 Además, la invención también se refiere a un péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la invención y, en particular, como se define en las reivindicaciones para su uso en la prevención o el tratamiento del melanoma en un paciente.

**Descripción detallada de la invención**

**Definiciones:**

20

A lo largo de la memoria descriptiva, se emplean varios términos y se definen en los párrafos siguientes.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene menos de 50 aminoácidos. Tal 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.

Los péptidos antigénicos de melanoma de la invención se describen en la tabla A.

SEQ ID número	Secuencias	Nomenclaturas utilizadas en la solicitud de patente
SEQ ID NO: 1 del péptido	SCVGYPDEATSREQFLPSEC	MELOE-1 <sub>2-21</sub> o 2-21
SEQ ID NO: 2 del péptido	VGYPDEATSREQFLPS	MELOE-1 <sub>4-19</sub> o 4-19
SEQ ID NO: 3 del péptido	VGYPDEATSREQFL	MELOE-1 <sub>4-17</sub> o 4-17
SEQ ID NO: 4 del péptido	GYPDEATSREQFLPS	MELOE-1 <sub>5-19</sub> o 5-19
SEQ ID NO: 5 del péptido	PDEATSREQFLPS	MELOE-1 <sub>7-19</sub> o 7-19
SEQ ID NO: 6 del péptido	PWHPSERISSTLNDECWPASL	MELOE-1 <sub>26-46</sub> o 26-46
SEQ ID NO: 7 del péptido	RISSTLNDECWPAS	MELOE-1 <sub>32-45</sub> o 32-45
SEQ ID NO: 8 del péptido	RISSTLNDECWPA	MELOE-1 <sub>32-44</sub> o 32-44
SEQ ID NO: 9 del péptido	ERISSTLNDECWPA	MELOE-1 <sub>31-44</sub> o 31-44
SEQ ID NO: 10 del péptido	TSREQFLPSEGAACPPWHPS	MELOE-1 <sub>11-30</sub> o 11-30
SEQ ID NO: 11 del péptido	REQFLPSEGAACPPW	MELOE-1 <sub>13-27</sub> o 13-27

30

(continuación)

SEQ ID número	Secuencias	Nomenclaturas utilizadas en la solicitud de patente
SEQ ID NO: 12 del péptido	EQFLPSEGAACPPW	MELOE-1 <sub>14-27</sub> o 14-27
SEQ ID NO: 13 del péptido	QFLPSEGAACPPW	MELOE-1 <sub>15-27</sub> o 15-27
SEQ ID NO: 14 del péptido	TSREQFLPSEGAA	MELOE-1 <sub>11-23</sub> o 11-23
SEQ ID NO: 15 del péptido	SREQFLPSEGAAC	MELOE-1 <sub>12-24</sub> o 12-24
SEQ ID NO: 16 del péptido	PSEGAACPPWHPSERISSTL	MELOE-1 <sub>18-37</sub> o 18-37
SEQ ID NO: 17 del péptido	AACPPWHPSERISSTLNDECWPASL	MELOE-1 <sub>22-46</sub> o 22-46
SEQ ID NO: 18 del péptido	CPPWHPSERISSTL	MELOE-1 <sub>24-37</sub> o 24-37
SEQ ID NO: 19 del péptido	CPPWHPSERISST	MELOE-1 <sub>24-36</sub> o 24-36
SEQ ID NO: 20 del péptido	MSCVGYPDEATSREQFLPSEGAACPPW HPSERISSTLNDECWPASL	MELOE-1 <sub>1-46</sub> o 1-46
SEQ ID NO: 21 del péptido	GHGHSYTTAEELAGIGILTVILGVL	Melan-A <sub>16-40L</sub>
Tabla A: péptidos antigénicos de melanoma de la invención		

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína capaz de unirse específicamente a un antígeno, normalmente y preferentemente mediante la unión de 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')<sub>2</sub>, dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Las "variantes conservadoras de la función", como se usan en el presente documento, se refieren a aquellas en las que un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima se ha cambiado (insertado, eliminado o sustituido) sin alterar la conformación y función general del polipéptido. Dichas variantes incluyen proteínas que tienen alteraciones de aminoácidos tales como eliminaciones, inserciones y/o sustituciones. Una "eliminación" 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. Normalmente, un aminoácido dado se reemplaza por un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de tal forma que puede variar el porcentaje de similitud de secuencia de proteína o aminoácido entre dos proteínas cualquiera con una función similar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % según lo determinado de acuerdo con un esquema de alineación tal como por el Método de Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60 % de identidad de aminoácidos como se determina por los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente aún al menos un 90 %, y todavía más preferentemente al menos un 95 %, y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína natural o precursora 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) en toda la longitud de la secuencia más corta. Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineación utilizando, por ejemplo, el programa de acumulación GCG (Genetics Computer Group, Manual de programa para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los

algoritmos de comparación de secuencias como BLAST, FASTA, etc.

5 El término "Complejo principal de histocompatibilidad" (MHC, de sus siglas en inglés) es una designación genérica destinada a abarcar los sistemas de antígenos de histocompatibilidad descritos en diferentes especies, incluidos los antígenos leucocitarios humanos (HLA, de sus siglas en inglés).

El término "melanoma" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, todos los tipos de cánceres de melanocitos en todas las etapas de progresión, como el cáncer de melanocitos metastásico.

10 El término "tratar" un trastorno o una afección se refiere a revertir, 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.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "paciente" significa un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente un paciente de acuerdo con la invención es un ser humano.

20 Una "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, está destinada a una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para impartir beneficios terapéuticos a un paciente. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz del agente activo" para un paciente es una cantidad del agente activo que induce, mejora o causa una mejora en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o las condiciones físicas asociadas con la enfermedad que afecta al paciente.

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

***Péptido, proteína de fusión y usos de los mismos***

30 Un primer objeto de la invención se refiere a un péptido antigénico de melanoma como se define en las reivindicaciones.

Los péptidos antigénicos de melanoma de la invención, se generan a partir del péptido MELOE-1 (SEQ ID NO: 20) como se describe en la solicitud de patente WO 2010 026165 y en la tabla A.

35 En una realización, el péptido antigénico de melanoma de la invención no es el péptido MELOE-1 (SEQ ID NO: 20).

En una realización de la invención, por "péptido antigénico" se entiende un péptido capaz de unirse a la molécula HLA y causar una respuesta celular o humoral en un paciente.

40 En una realización preferida de la invención, dicho péptido antigénico puede comprender un motivo específico tal que el polipéptido se una a una molécula HLA e induzca una respuesta de CTL.

45 En otra realización preferida de la invención, dicho péptido antigénico puede comprender un motivo específico tal que el polipéptido se una a una molécula HLA e induzca una respuesta de linfocitos T auxiliares.

En una realización de la invención, dichos péptidos antigénicos de melanoma como se describió anteriormente en el presente documento están restringidos a HLA-DRβ1\*1101.

50 En una realización de la invención, dichos péptidos antigénicos de melanoma como se describió anteriormente en el presente documento están restringidos a HLA-DRβ1\*0101.

La presente solicitud desvela un péptido antigénico que

- 55 - es una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 como se define anteriormente en el presente documento.
- es una secuencia de aminoácidos de menos de 45 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 como se define anteriormente en el presente documento.
- es una secuencia de aminoácidos de menos de 40 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 como se define anteriormente en el presente documento.
- 60 - es una secuencia de aminoácidos de menos de 30 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 como se define anteriormente en el presente documento.
- es una secuencia de aminoácidos de menos de 25 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 como se define anteriormente en el presente documento.

65 La presente invención también describe, un péptido antigénico que comprende al menos un 60 % de identidad sobre dicha SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15, incluso, más preferentemente, al menos un 700 %, al menos un 80 %, al

menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % y todavía es capaz de unirse a la molécula HLA y provocar una respuesta celular o humoral en un paciente.

5 Como también se describe, el péptido antigénico consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o una variante del mismo que comprende al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y aún es capaz de unirse a la molécula HLA y provocar una respuesta celular o humoral en un paciente.

10 También se describen péptidos que son variantes conservadoras de la función de péptidos antigénicos que comprenden la SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 como se describe anteriormente en el presente documento.

15 También se describen péptidos sustancialmente idénticos a los péptidos antigénicos que comprenden la SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 en la que uno o más restos han sido sustituidos de forma conservadora con un resto funcionalmente similar y que muestra los aspectos funcionales de los péptidos antigénicos que comprenden la SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 o 15 como se describe anteriormente en el presente documento, es decir, todavía son capaces de unirse a una molécula HLA de la misma manera sustancial que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos dada.

20 Los ejemplos de sustituciones conservadoras 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.

25 La expresión "sustitución conservadora" también incluye el uso de un resto derivatizado químicamente en lugar de un resto no derivatizado. "Derivado químico" se refiere a un péptido del paciente que tiene uno o más restos derivatizados químicamente por reacción de un grupo lateral funcional. Los ejemplos de dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que se han derivatizado grupos amino libres para formar hidrocloruros de amina, grupos *p*-tolueno-sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos *t*-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados de O-acilo o de O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de la 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 estándar. Por ejemplo: la 4-hidroxi prolina puede ser sustituida con prolina; la 5-hidroxisilisina puede ser sustituida con lisina; la 3-metilhistidina puede ser sustituida con histidina; la homoserina puede ser sustituida con serina; y la ornitina puede ser sustituida con lisina.

De acuerdo con la invención, los péptidos antigénicos de la invención pueden obtenerse mediante la síntesis de los péptidos de acuerdo con el método para la síntesis de péptidos conocido en la materia.

40 En otra realización, los péptidos antigénicos de la invención pueden incorporarse en politopos o proteínas de fusión. Dos o más péptidos de la invención se pueden unir directamente, o mediante el uso de secuencias flanqueantes. Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (13): 5845- 5849 (1995), enseña el enlace directo de secuencias epitópicas relevantes. El uso de politopos o proteínas de fusión como vacunas es bien conocido. Véase, por ejemplo, Gilbert et al., Nat. Biotechnol. 15 (12): 1280-1284 (1997); Thomson et al., citado anteriormente; Thomson et al., J. Immunol. 157 (2): 822- 826 (1996); Tam et al., J. Exp. Med. 171 (1): 299-306 (1990). La referencia de Tam et al., en particular, muestra que los politopos o proteínas de fusión, cuando se usan en un modelo de ratón, son útiles para generar tanto inmunidad protectora como anticuerpos.

50 Por lo tanto, la invención también se refiere a una proteína de fusión que comprende un péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la invención y un péptido antigénico de melanoma que comprende el motivo de aminoácidos:

- TX2NDECWPX9 (SEQ ID NO: 22)

55 en el que X2 es leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X9 es alanina, valina o leucina.

En una realización de la invención, dicho segundo péptido antigénico de melanoma se selecciona en el grupo que consiste en péptidos que tienen la secuencia SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 37 como se describe a continuación.

SEQ ID NO: 23 del péptido	X <sub>2</sub> = L	X <sub>9</sub> = A	TLNDECWPA
SEQ ID NO: 24 del péptido	X <sub>2</sub> = M	X <sub>9</sub> = A	TMNDECWPA
SEQ ID NO: 25 del péptido	X <sub>2</sub> = V	X <sub>9</sub> = A	TVNDECWPA
SEQ ID NO: 26 del péptido	X <sub>2</sub> = I	X <sub>9</sub> = A	TINDECWPA
SEQ ID NO: 27 del péptido	X <sub>2</sub> = Q	X <sub>9</sub> = A	TQNDECWPA
SEQ ID NO: 28 del péptido	X <sub>2</sub> = L	X <sub>9</sub> = V	TLNDECWPV
SEQ ID NO: 29 del péptido	X <sub>2</sub> = M	X <sub>9</sub> = V	TMNDECWPV
SEQ ID NO: 30 del péptido	X <sub>2</sub> = V	X <sub>9</sub> = V	TVNDECWPV
SEQ ID NO: 31 del péptido	X <sub>2</sub> = I	X <sub>9</sub> = V	TINDECWPV
SEQ ID NO: 32 del péptido	X <sub>2</sub> = Q	X <sub>9</sub> = V	TQNDECWPV
SEQ ID NO: 33 del péptido	X <sub>2</sub> = L	X <sub>9</sub> = L	TLNDECWPL
SEQ ID NO: 34 del péptido	X <sub>2</sub> = M	X <sub>9</sub> = L	TMNDECWPL
SEQ ID NO: 35 del péptido	X <sub>2</sub> = V	X <sub>9</sub> = L	TVNDECWPL
SEQ ID NO: 36 del péptido	X <sub>2</sub> = I	X <sub>9</sub> = L	TINDECWPL
SEQ ID NO: 37 del péptido	X <sub>2</sub> = Q	X <sub>9</sub> = L	TQNDECWPL

En otra realización, el péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la invención o la proteína de fusión de acuerdo con la invención se pueden usar en la prevención o el tratamiento del melanoma en un paciente.

- 5 En una realización, dicho paciente se genotipa con HLA-DRβ1\*1101 o HLA-DRβ1\*0101.

**Ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras recombinantes y usos de los mismos**

- 10 Otro objeto de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la invención o una proteína de fusión de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la invención o una proteína de fusión de acuerdo con la invención.

- 15 Como se describe en el presente documento, dicho vector de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico correspondiente a un péptido antigénico de melanoma que tiene la secuencia SEQ ID NO: 10 a SEQ ID NO: 15. En una realización de la invención, dicho vector de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico correspondiente a un péptido antigénico de melanoma como se define en las reivindicaciones.

- 20 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 a la secuencia de ácido nucleico. Los elementos de control de 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 expresión incluyen, pero no se limitan a, sistema lac, regiones de operador y promotor de fago lambda, promotores de levadura y promotores procedentes de polioma, adenovirus, retrovirus, lentivirus o SV40. Los elementos operativos preferidos o requeridos adicionales incluyen, pero no se limitan a, secuencia líder, codones de terminación, señales de poliadenilación y cualquier otra secuencia necesaria o preferida para la transcripción apropiada y la traducción posterior de la secuencia de ácido nucleico en el sistema hospedador. Un experto en la materia entenderá que la combinación correcta de elementos de control de expresión requeridos o preferentes dependerá del sistema hospedador elegido. Se entenderá además que el vector de expresión debe contener 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 no se limitan a, orígenes de replicación y marcadores seleccionables. Además, un experto en la materia entenderá que dichos vectores se construyen fácilmente usando métodos convencionales o disponibles comercialmente.

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

- 40 De acuerdo con la invención, ejemplos de células hospedadoras que pueden usarse son células eucariotas, tales

como células de animales, plantas, insectos y levaduras y células procariotas, tal como *E. coli*. Los medios por los cuales el vector que lleva el gen puede introducirse en las células incluyen, pero no se limitan a, microinyección, electroporación, transducción o transfección usando DEAE-dextrano, lipofección, fosfato de calcio u otros procedimientos conocidos por un experto en la materia.

5 En una realización preferida, se usan vectores de expresión eucariotas que funcionan en células eucariotas. Los ejemplos de tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores víricos tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, 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 no se limitan a, células COS, células CHO, células HeLa, células NIH/3T3, células 293 (ATCC n.º CRL1573), linfocitos T2, células dendríticas o monocitos.

10 En una realización, la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o el vector de expresión de acuerdo con la invención o la célula hospedadora de acuerdo con la invención puede usarse en la prevención o el tratamiento del melanoma en un paciente.

**Anticuerpos y usos de los mismos**

20 Otro objeto de la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la invención.

25 Como se describe en el presente documento, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une al péptido antigénico de melanoma que tiene la secuencia SEQ ID NO: 10 a SEQ ID NO: 15. En una realización de la invención, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une al péptido antigénico de melanoma como se define en las reivindicaciones.

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

30 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.

**Múltimero de MHC/péptido**

35 Otro objeto de la invención se refiere a un múltimero de MHC/péptido que comprende un péptido antigénico de melanoma como se describe anteriormente en el presente documento. De acuerdo con la invención, dicho múltimero de MHC/péptido incluye, pero no se limitan a, un dímero, trímero, tetrámero o pentámero de MHC/péptido.

40 En una realización de la invención, dicho múltimero de MHC/péptido es un múltimero de HLA-clase II/péptido.

En otra realización de la invención, dicho múltimero de MHC/péptido es un múltimero de HLA-DRβ1\*1101/péptido antigénico de melanoma o un múltimero de HLA-DRβ1\*0101/péptido antigénico de melanoma.

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

50 En una realización de la invención, dicho múltimero de MHC/péptido se puede usar para visualizar poblaciones de linfocitos T que son específicas para el múltimero complejo de HLA-DRβ1\*1101/péptido antigénico de melanoma o HLA-DRβ1\*0101/péptido antigénico de melanoma como se describe anteriormente en el presente documento.

55 En otra realización de la invención, dicho múltimero de MHC/péptido puede usarse para la detección y/o aislamiento mediante selección (en citometría de flujo o mediante selección inmunomagnética) de una población de linfocitos T que son específicos para un complejo HLA/péptido antigénico de melanoma como se describe anteriormente en el presente documento.

60 En otra realización de la invención, dicho múltimero de HLA-DRβ1\*1101/péptido antigénico de melanoma o HLA-DRβ1\*0101/péptido antigénico de melanoma se puede usar para la detección y/o aislamiento mediante selección (en citometría de flujo o mediante selección inmunomagnética) de una población de linfocitos T que son específicos para un múltimero complejo de HLA-DRβ1\*1101/péptido antigénico de melanoma o HLA-DRβ1\*0101/péptido antigénico de melanoma como se describe anteriormente en el presente documento.

Otro objeto de la invención son las perlas recubiertas con múltimeros de MHC/péptido como se describe anteriormente en el presente documento.

65 **Composición inmunizante y usos de la misma**

Otro objeto de la invención se refiere a una composición inmunizante que comprende:

- 5 (a) al menos un péptido antigénico de melanoma como se describe anteriormente en el presente documento o
- (b) al menos una proteína de fusión como se describe anteriormente en el presente documento, o
- (c) al menos una secuencia de ácido nucleico como se describe anteriormente en el presente documento, o
- (d) al menos un vector de expresión como se describe anteriormente en el presente documento, o
- (e) al menos una célula hospedadora como se describe anteriormente en el presente documento, o
- (f) al menos un anticuerpo como se describe anteriormente en el presente documento.

10 Como se describe en el presente documento, dicha composición inmunizante comprende un péptido antigénico de melanoma que tiene una secuencia SEQ ID NO: 10 a SEQ ID NO: 15. En una realización, dicha composición inmunizante comprende un péptido antigénico de melanoma como se define en las reivindicaciones.

15 La administración profiláctica de la composición inmunizante de la invención debería servir 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 profilácticamente con la composición inmunizante de la invención. Los ejemplos de dichos mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos con antecedentes familiares de melanoma.

20 Cuando se proporcionan de manera terapéutica, la composición inmunizante de la invención se proporciona para mejorar la propia respuesta inmunitaria del paciente al antígeno de melanoma presente en el melanoma o melanoma metastásico.

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

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

30 En dicha realización, dicha composición inmunizante, para uso humano, comprende al menos un péptido antigénico como se describe anteriormente en el presente documento o al menos un anticuerpo como se describe anteriormente en el presente documento, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. Los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Las composiciones inmunizantes pueden presentarse, de manera conveniente, en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica.

35 Las composiciones inmunizantes adecuadas para administración intravenosa, intradérmica, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal comprenden, de manera conveniente, soluciones acuosas estériles del agente activo con soluciones que son, preferentemente, isotónicas con la sangre del receptor. Dichas composiciones pueden prepararse, de manera conveniente, mediante la disolución del principio activo sólido en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles, tales como cloruro de sodio (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 que hace a dicha solución estéril. Éstas pueden estar presentes en recipientes unitarios o de múltiples dosis, por ejemplo, viales o ampollas selladas.

45 Las composiciones inmunizantes de la invención pueden incorporar un estabilizador. Los estabilizadores ilustrativos son polietilenglicol, proteínas, sacáridos, aminoácidos, ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos que pueden usarse solos o como mezclas. Estos estabilizadores se incorporan preferentemente en una cantidad de 0,1-10.000 partes en peso por parte en peso de agente activo. Si se van a usar 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 pH apropiados. La presión osmótica específica de dichas soluciones acuosas generalmente está 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 estar dentro del intervalo de 5,0-9,0, preferentemente, dentro del intervalo de 6-8.

55 Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción. Pueden conseguirse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de un polímero para formar complejo con o absorber los péptidos de la invención. La administración controlada puede ejercerse mediante la selección de macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliéster, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, etilvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina) y la concentración de macromoléculas, así como los de métodos de incorporación con el fin de controlar la liberación. Otro posible método para controlar la duración de la acción mediante preparaciones de liberación controlada es incorporar los péptidos antigénicos de la invención en partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de etileno y acetato de vinilo. Alternativamente, en lugar de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, o en sistemas de administración de fármacos coloidales, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones.

Cuando se desean preparaciones orales, las composiciones se pueden combinar con vehículos típicos, tales como lactosa, sacarosa, almidón, talco estearato de magnesio, celulosa cristalina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, glicerina, alginato de sodio o goma arábiga entre otros.

5 La inmunización de un paciente con la composición inmunizante de la invención puede realizarse mediante métodos convencionales, por ejemplo, en presencia de adyuvantes convencionales. Los ejemplos de adyuvante convencional incluyen, pero no se limitan a, sales de metales, emulsiones de aceite en agua, receptores agonistas tipo Toll, saponinas, lípido A, fosfato de alquil glucosaminida, adyuvante de Freund, hemocianina de lapa californiana (KLH, 10 de sus siglas en inglés), manano, BCG, alumbre, citocinas, tales como IL-1, IL-2, factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral; y otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes, tales como péptidos de muramilo o componentes de la pared celular bacteriana, toxinas, toxoides y ligandos TLR.

15 La composición inmunizante puede administrarse mediante cualquier vía apropiada para la producción de anticuerpos y/o activación de linfocitos T, tal como intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea y similares. La composición inmunizante se puede administrar una vez o a intervalos periódicos hasta que se produzca un título significativo de células inmunitarias anti-Nectin4 o anticuerpo anti-Nectin4. La presencia de células inmunitarias anti-Nectin4 se puede evaluar mediante la medición de la frecuencia de los CTL (linfocitos T citotóxicos) 20 precursores contra los péptidos antigénicos de la invención antes y después de la inmunización mediante marcado específico de tetrámero o mediante un ensayo de análisis de precursores CTL. El anticuerpo puede detectarse en el suero usando un inmunoensayo.

25 Los anticuerpos dirigidos a los antígenos de la invención también se pueden usar directamente como agentes antimelanoma. Para preparar anticuerpos, un animal hospedador puede inmunizarse usando el péptido antigénico de melanoma como se describe anteriormente en el presente documento. El suero o plasma hospedador se recoge después de un tiempo apropiado para proporcionar una composición que comprende anticuerpos reactivos a dichos péptidos antigénicos. La fracción de gammaglobulina o los anticuerpos IgG se pueden obtener, por ejemplo, mediante el uso de sulfato de amonio saturado o DEAE Sephadex, u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los anticuerpos están sustancialmente libres de muchos de los efectos secundarios adversos que pueden 30 estar asociados con otros agentes antineoplásicos, tales como la quimioterapia.

35 La composición inmunizante de la invención que comprende anticuerpos como se describe anteriormente en el presente documento, puede hacerse aún más compatible con el sistema hospedador minimizando las posibles respuestas adversas del sistema inmunitario. Esto se logra mediante la eliminación de todo o una porción de la porción Fc de un anticuerpo de una especie extraña o usando un anticuerpo de la misma especie que el paciente hospedador, por ejemplo, el uso de anticuerpos de seres humanos/híbridos humanos. Los anticuerpos humanizados (es decir, no inmunogénicos en un ser humano) pueden producirse, por ejemplo, mediante el reemplazo de una porción inmunogénica de un anticuerpo con una porción correspondiente, pero no inmunogénica (es decir, anticuerpos quiméricos). Dichos anticuerpos quiméricos pueden contener la porción reactiva o de unión a 40 antígeno de un anticuerpo de una especie y la porción Fc de un anticuerpo (no inmunogénico) de una especie diferente. Los ejemplos de anticuerpos quiméricos, incluyen, pero sin limitación, quimeras de mamíferos no humano-humano, quimeras de roedor-humano, quimeras de murino-humano y rata-humano.

45 Los métodos para obtener dichos anticuerpos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos quiméricos humanizados son bien conocidos en la materia.

50 La composición inmunizante que comprende los anticuerpos de la invención también se puede usar como un medio para potenciar la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos pueden administrarse en cantidades similares a las utilizadas para otras administraciones terapéuticas de anticuerpos. Por ejemplo, la gammaglobulina agrupada se administra en un intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg por paciente. Por lo tanto, los anticuerpos reactivos con los péptidos antigénicos de la invención pueden administrarse pasivamente solos o en combinación con otras terapias antineoplásicas a un mamífero afectado por cáncer. Los ejemplos de terapias contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia, radioterapia, terapia de inmunoterapia adoptiva con TIL.

55 Los anticuerpos o anticuerpos quiméricos descritos en el presente documento también pueden acoplarse a moléculas de toxina, radioisótopos y fármacos mediante métodos convencionales. Los ejemplos de toxinas a las que se pueden acoplar los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, ricina o toxina diftérica. Los ejemplos de fármacos o agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, ciclofosfamida o doxorubicina. Los ejemplos de radioisótopos, incluyen, pero no se limitan a, <sup>131</sup>I. Los anticuerpos conjugados covalentemente con los agentes 60 mencionados anteriormente pueden usarse en inmunoterapia contra el cáncer para tratar el melanoma.

65 Si el paciente que se va a inmunizar ya está afectado por cáncer o cáncer metastásico, la composición inmunizante de la invención se puede administrar junto con otros tratamientos terapéuticos. Los ejemplos de otros tratamientos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, inmunoterapia adoptiva de linfocitos T, coadministración de citocinas u otros fármacos terapéuticos para el cáncer.

La dosis de péptido antigénico de la invención a administrar a un paciente puede ajustarse según sea apropiado dependiendo de, por ejemplo, la enfermedad que se vaya a tratar, la edad y el peso corporal de dicho paciente. Los intervalos de péptidos antigénicos de la invención que pueden administrarse son de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg por paciente, las dosis preferentes son de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg por paciente.

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

Otro objeto de la invención se refiere a una composición inmunizante como se describe anteriormente para su uso en la prevención o el tratamiento del melanoma en un paciente que lo necesita.

En otra realización, dicho paciente se genotipa con alelos HLA-DR $\beta$ 1\*1001 o HLA-DR $\beta$ 1\*0101.

### ***Célula presentadora de antígenos***

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

En una realización de la invención, dicho antígeno HLA complejo es un antígeno HLA-DR $\beta$ 1\*1101 o HLA-DR $\beta$ 1\*0101.

En una realización de la invención, dicha célula presentadora de antígeno procede del paciente a tratar.

La expresión "célula presentadora de antígeno" (APC, de sus siglas en inglés) se refiere a cualquier célula que expresa un antígeno HLA capaz de presentar el péptido antigénico de la invención en su superficie. Se prefieren las células dendríticas, que según se informa tienen una capacidad de presentación de antígeno especialmente alta. En otra realización, también se pueden usar APC artificiales, tales como células de mamífero (fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos) o líneas celulares.

Para preparar dichas APC de la invención, las células que tienen una capacidad de presentación de antígeno se aíslan del paciente a tratar y se pulsan ex vivo con al menos un péptido antigénico de la invención para formar un complejo con el antígeno HLA-DR $\beta$ 1\*1101 o HLA-DR $\beta$ 1\*0101.

En caso de que se usen células dendríticas, la APC de la invención se puede preparar como sigue. Los linfocitos se aíslan de la sangre periférica del paciente para tratarse mediante el método Ficoll; las células adherentes se separan de las células no adherentes; las células adherentes se cultivan luego en presencia de GM-CSF e IL-4 para inducir células dendríticas; y las células dendríticas se pulsan mediante el cultivo con al menos un péptido antigénico de la invención para obtener las APC de la invención. Las células dendríticas deben exponerse al péptido antigénico durante un tiempo suficiente para permitir que los antígenos se internalicen y se presenten en la superficie de las células dendríticas. Las células dendríticas resultantes se pueden volver a administrar al paciente a tratar. Dichos métodos se describen en los documentos WO93/208185 y EP0563485.

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

En una realización de la invención, dichas células presentadoras de antígeno comprenden un antígeno complejo HLA-DR $\beta$ 1\*1101 o HLA-DR $\beta$ 1\*0101 y un péptido antigénico 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 similar. La administración se puede lograr, por ejemplo, por vía intravenosa, hipodérmica o intradérmica.

### ***Linfocitos T y usos de los mismos***

Otro objeto de la invención se refiere a un linfocito T que reconoce específicamente el péptido antigénico de melanoma de la invención o el péptido antigénico de melanoma de la invención comprendido en una proteína de fusión de la invención.

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

En otra realización de la invención, dicho linfocito T está restringido por a HLA-DR $\beta$ 1\*1101 o HLA-DR $\beta$ 1\*0101.

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

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

10 Otro objeto de la invención es una composición para terapia adoptiva que comprende dichos linfocitos T como se describe anteriormente en el presente documento, que reconoce específicamente el péptido antigénico de melanoma de la invención o el péptido antigénico de melanoma de la invención comprendido en una proteína de fusión de la invención.

15 En el caso del melanoma, se ha observado que una inmunoterapia adoptiva, en la que el infiltrado intratumoral de linfocitos T tomado del paciente a tratar se cultiva *ex vivo* en grandes cantidades y luego se devuelve al paciente, logra una ganancia terapéutica.

20 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 se puede lograr, por ejemplo, por vía intravenosa o intratumoral. Devolviendo los linfocitos T que reconocen específicamente el péptido antigénico de la invención al cuerpo del paciente, la toxicidad de dichos linfocitos T o la estimulación de los linfocitos T citotóxicos CD8 por dichas células hacia las células tumorales aumenta en el paciente que es positivo para el péptido antigénico de melanoma de la invención. Las células tumorales se destruyen y, por lo tanto, se logra el tratamiento del tumor.

25 Los ejemplos de dónde pueden aislarse los linfocitos T, incluyen, pero sin limitación, linfocitos de células sanguíneas periféricas (PBL, de sus siglas en inglés), ganglios linfáticos o linfocitos infiltrantes de tumores (TIL).

30 Dichos linfocitos pueden aislarse del tumor o de la sangre periférica del individuo a tratar mediante métodos conocidos en la materia y cultivarse *in vitro*. Los linfocitos se cultivan en medios tales como RPMI o RPMI 1640 durante 2-5 semanas, preferentemente durante 2-3 semanas. La viabilidad se evalúa mediante el ensayo de exclusión con colorante azul de tripano. Los linfocitos se exponen al péptido antigénico de la invención durante toda la duración del cultivo.

35 En una realización preferida, los linfocitos se exponen al péptido antigénico de melanoma de la invención a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 microgramos ( $\mu\text{g}$ )/ml durante toda la duración del cultivo de linfocitos. Se pueden añadir citocinas al cultivo de linfocitos, tal como IL-2.

El péptido antigénico de melanoma de la invención se puede añadir al cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas o células de línea celular de cáncer alogénicas irradiadas.

40 Después de sensibilizarse al péptido, los linfocitos T se administran al paciente que necesita dicho tratamiento.

45 Los ejemplos de cómo se pueden administrar estos linfocitos T sensibilizados al mamífero incluyen, pero no se limitan a, por vía intravenosa, intraperitoneal o intralesional. Los parámetros que pueden evaluarse para determinar la eficacia de estos linfocitos T sensibilizados incluyen, pero no se limitan a, la producción de células inmunitarias en el paciente que se está tratando o la regresión tumoral. Se utilizan métodos convencionales para evaluar estos parámetros. Dicho tratamiento puede administrarse junto con citocinas o células modificadas genéticamente (Rosenberg, S.A. et al. (1992) *Human Gene Therapy*, 3: 75-90; Rosenberg, S.A. et al. (1992) *Human Gene Therapy*, 3: 57-73).

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

- 55 (a) estimular células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés) o linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) obtenidos de un paciente con al menos un péptido antigénico de melanoma de la invención o una proteína de fusión de la invención,  
 (b) enriquecer la población de linfocitos T específicos para el péptido(s) antígeno de melanoma utilizado en (a),  
 (c) opcionalmente, clonar dicha población de linfocitos T específicos para el péptido(s) antígeno de melanoma utilizado en (a).

60 El enriquecimiento y/o la clonación se pueden llevar a cabo utilizando un multímero de MHC/péptido como se describe anteriormente en el presente documento. La clonación también puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales.

65 En una realización de la invención, los linfocitos T que reconocen específicamente un péptido antigénico de melanoma de la invención están restringidos a HLA-DR $\beta$ 1\*1001 o HLA-DR $\beta$ 1\*0101. En dicha realización, el enriquecimiento y/o la clonación pueden llevarse a cabo utilizando un multímero de HLA-DR $\beta$ 1\*1101 o HLA-

DRβ1\*0101/péptido como se describe anteriormente en el presente documento.

La estimulación de PBMC puede llevarse a cabo con al menos un péptido antigénico de melanoma de la invención solo, o presentarse mediante una célula presentadora de antígeno tal como células dendríticas o células de línea celular de cáncer alogénicas irradiadas. Normalmente, las citocinas, como la IL-2, también se pueden añadir al cultivo.

Otro objeto de la invención es una composición para terapia adoptiva que comprende linfocitos que reconocen específicamente el péptido antigénico de melanoma de la invención para prevenir o tratar el melanoma en un paciente que lo necesite, en la que dichos linfocitos T deben volver a administrarse al paciente.

En una realización, dichos linfocitos que reconocen específicamente el péptido antigénico de la invención están restringidos a HLA-DRβ1\*1101 o HLA-DRβ1\*0101.

La invención también se refiere a un método para prevenir o tratar el melanoma en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de

- (a) al menos un péptido antigénico de melanoma como se describe anteriormente en el presente documento o
- (b) al menos una proteína de fusión como se describe anteriormente en el presente documento, o
- (c) al menos una secuencia de ácido nucleico como se describe anteriormente en el presente documento, o
- (d) al menos un vector de expresión como se describe anteriormente en el presente documento, o
- (e) al menos una célula hospedadora como se describe anteriormente en el presente documento, o
- (f) al menos un anticuerpo como se describe anteriormente en el presente documento.

La invención también se refiere a un método para prevenir o tratar el melanoma en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T que reconoce específicamente el péptido antigénico de melanoma de la invención. En una realización, dichos linfocitos T están restringidos a HLA-DRβ1\*1101 o HLA-DRβ1\*0101.

La invención también se refiere a un método para prevenir o tratar el melanoma en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células presentadoras de antígeno que comprenden un antígeno HLA complejo y un péptido antigénico de melanoma de la invención. En una realización, dicho HLA complejo/péptido es un HLA complejo-DRβ1\*1101 o HLA-DRβ1\*0101/péptido antigénico de la invención.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

### Descripción de las figuras

**Figura 1:** (A) Porcentajes de linfocitos T CD4 productores de TNF-α entre microcultivos positivos. Catorce días después de la estimulación de PBMC con el polipéptido completo MELOE-1 (2-46), los microcultivos se reestimularon con cada péptido indicado durante 5 horas. La producción de TNF-α se evaluó luego mediante un doble marcaje TNF-α-CD4. Los resultados se analizaron con una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de una prueba posterior de Dunns. (B) Frecuencia de microcultivos que contienen linfocitos T CD4 específicos para péptidos MELOE-1 (evaluado mediante tinción intracelular de TNF-α después de la reestimulación con los 4 péptidos indicados). Se analizaron 624 microcultivos (de 7 donantes sanos) mediante una tabla de contingencia seguida de una prueba exacta de Fisher.

**Figura 2:** (A) Porcentajes de linfocitos T CD4 productores de citocina entre microcultivos positivos. Catorce días después de la estimulación de PBMC con el polipéptido completo MELOE-1 (2-46), los microcultivos se reestimularon con cada péptido indicado durante 5 horas. La producción de IFN-γ (panel izquierdo) e IL4 (panel derecho) se evaluó luego mediante un triple marcaje de IFN-γ-IL4-CD4. Los resultados se analizaron con una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de una prueba posterior de Dunns. (B) Frecuencia de microcultivos que contienen linfocitos T CD4 específicos para péptidos MELOE-1 (evaluado mediante tinción intracelular de IFN-γ o IL4 después de la reestimulación con los 3 péptidos indicados). Se analizaron 576 microcultivos (de 10 pacientes con melanoma) mediante una tabla de contingencia seguida de una prueba exacta de Fisher. Las leyendas A y B se invirtieron en la versión que te envié.

**Figura 3:** Elemento restrictivo de HLA de clones de linfocitos T específicos de MELOE-1 y reactividad contra líneas celulares de melanoma emparejado con HLA. La restricción de HLA de los clones de linfocitos T específicos de MELOE-1 se evaluó primero usando anticuerpos de bloqueo anti-HLA (panel superior). Los clones de linfocitos T se estimularon durante 5 horas en presencia de brefeldina A (10 μg/ml) o con péptido solo (10 μM) en un ensayo de presentación automática y en presencia o no de anticuerpos bloqueantes a una concentración de 12,5 μg/ml. La restricción de HLA se confirmó con líneas celulares B-EBV emparejadas con HLA pulsadas 2 horas con el péptido afín, en una relación 1:2 (panel central). La reactividad de cada clon de linfocitos T contra células de melanoma que expresan HLA-clase II se evaluó en presencia o no de péptido exógeno (panel inferior).

Después de 5 horas de estimulación, las células se tiñeron luego con AcM anti-CD4 conjugado con APC, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se marcaron con AcM anti-TNF- $\alpha$  conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo.

5 **Figura 4:** Los epítomos de clase II se procesan de manera natural a partir del antígeno completo MELOE-1. Las CD autólogas se cargaron (antes o después de la fijación) con MELOE-1<sub>2-46</sub> (1  $\mu$ M) o, como control negativo, con el péptido Melan-A<sub>16-40L</sub> (1  $\mu$ M) y se dejaron madurar. Los clones de linfocitos T se estimularon con CD en una proporción 1:1, durante 5 horas en presencia de Brefeldina A, luego se tiñeron con AcM anti-CD3 conjugado con APC, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se marcaron con AcM anti-TNF- $\alpha$  conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran el % de células productoras de TNF-a entre los linfocitos T CD3 positivos.

15 **Figura 5:** Péptidos mínimos reconocidos por clones de linfocitos T CD4 específicos de MELOE-1. Los clones de linfocitos T CD4 específicos de MELOE-1 se incubaron con diversas concentraciones de los péptidos indicados durante 5 horas en presencia de Brefeldina A. La producción de TNF-a se evaluó mediante marcaje intracelular con un anticuerpo anti-TNF-a específico. La secuencia del péptido central se indica en negrita en cada panel de la figura, y los círculos negros ilustran el péptido que mejor se ajusta.

**Tabla I:** MELOE-1 y secuencias de péptidos procedentes de MELOE-1.

Péptido	Secuencias	SEQ ID NO
<b>MELOE-1</b>	MSCVGYDPDEATSREQFLPSEGAACPPWHPSERISSTLNDECWPASL	20
<b>MELOE-1</b> <sub>2-21</sub>	SCVGYDPDEATSREQFLPSEG	1
<b>MELOE-1</b> <sub>11-30</sub>	TSREQFLPSEGAACPPWHPS	10
<b>MELOE-1</b> <sub>18-37</sub>	PSEGAACPPWHPSERISSTL	16
<b>MELOE-1</b> <sub>26-46</sub>	<i>PWHPSERISSTLNDECWPASL</i>	6
<b>MELOE-1</b> <sub>22-46</sub>	AACPPWHPSERISSTLNDECWPASL	17

20 Todos los péptidos fueron adquiridos de la compañía Millegen (Francia), con una pureza > 85 %. En negrita se indican los epítomos superpuestos DR-11 (SEQ ID NO: 18) y DQ-6 (SEQ ID NO: 8) ya descritos, y en cursiva se indica el epítomo de clase I restringido HLA-A2 (TLNDECWPA, SEQ ID NO: 23)).

25 **Tabla II:** Evaluación de las respuestas de linfocitos T CD4+ MELOE-1 en PBMC de donantes sanos.

Donante	Microcultivos que contienen linfocitos T CD4+ específicos de MELOE-1 (producción de TNF- $\alpha$ )				HLA de clase II
	MELOE-1 <sub>2-21</sub>	MELOE-1 <sub>11-30</sub>	MELOE-1 <sub>18-37</sub>	MELOE-1 <sub>26-46</sub>	
<b>HD9</b>	9/96 (1,4 % $\pm$ 0,6)	13/96 (2,4 % $\pm$ 1,5)	6/96 (1,4 % $\pm$ 0,6)	5/96 (1,5 % $\pm$ 0,5)	DP $\beta$ 1* 0902/1501 DQ $\beta$ 1*0301 DR $\beta$ 1*1104/1201
<b>HD17</b>	6/96 (3,2 % $\pm$ 1,9)	26/96 (8,2 % $\pm$ 6,5)	7/96 (3 % $\pm$ 0,7)	10/96 (5,2 % $\pm$ 4,1)	DP $\beta$ 1* 0401/0301 DQ $\beta$ 1*0301/0603 DR $\beta$ 1*1101/1301
<b>HD22</b>	1/96 (1 %)	2/96 (3,9 % $\pm$ 3,3)	0/96	2/96 (1 % $\pm$ 0,1)	DP $\beta$ 1* 0401/1101 DQ $\beta$ 1*0202 DR $\beta$ 1*0701
<b>HD24</b>	3/96 (1,3 % $\pm$ 0,8)	46/96 (2 % $\pm$ 1,4)	0/96	0/96	DP $\beta$ 1* 0401/0101 DQ $\beta$ 1*0501/0602 DR $\beta$ 1*0101/1501

(continuación)

Donante	Microcultivos que contienen linfocitos T CD4+ específicos de MELOE-1 (producción de TNF- $\alpha$ )				HLA de clase II
	MELOE-1 <sub>2-21</sub>	MELOE-1 <sub>11-30</sub>	MELOE-1 <sub>18-37</sub>	MELOE-1 <sub>26-46</sub>	
HD25	3/96 (0,6 % $\pm$ 0,1)	3/96 (1,2 % $\pm$ 0,7)	0/96	15/96 (1,1 % $\pm$ 0,9)	DP $\beta$ 1* 0401/0402 DQ $\beta$ 1*0201 DR $\beta$ 1*0301
HD27	0/96	5/96 (5 % $\pm$ 3,4)	0/96	0/96	DP $\beta$ 1 NA DQ $\beta$ 1*501/0201 DR $\beta$ 1*0101/0301
HD28	30/48 (2,7 % $\pm$ 1,2)	14/48 (2,4 % $\pm$ 0,9)	0/48	0/96	DP $\beta$ 1 NA DQNA DR $\beta$ 1*0301

5 Las PBMC de donantes sanos se estimularon con 10  $\mu$ M de MELOE-1. Después de 14 días, se evaluó la presencia de linfocitos T CD4 específicos para las diferentes regiones de MELOE-1 mediante la reestimulación de células con péptidos MELOE-1<sub>2-21</sub>, MELOE-1<sub>11-30</sub>, MELOE-1<sub>18-37</sub> y MELOE-1<sub>26-46</sub>, seguido por doble tinción de CD4/TNF- $\alpha$  y análisis de citometría de flujo. Entre paréntesis se indica el % medio de linfocitos T CD4 productores de TNF- $\alpha$ , en microcultivos positivos. ND: no disponible.

**Tabla III:** Evaluación de las respuestas de linfocitos T CD4+ MELOE-1 en PBMC de pacientes con melanoma.

	Microcultivos que contienen linfocitos T CD4 específicos de MELOE-1					
	Respuestas Th1 (microcultivos positivos para IFN- $\gamma$ )			Respuestas Th2 (microcultivos positivos para IL4)		
	MELOE-1 <sub>2-21</sub>	MELOE-1 <sub>11-30</sub>	MELOE-1 <sub>22-46</sub>	MELOE-1 <sub>2-21</sub>	MELOE-1 <sub>11-30</sub>	MELOE-1 <sub>22-46</sub>
Pt # 1	1/48 (0,7 %)	10/48 (1,4 % $\pm$ 0,7)	11/48 (4,8 % $\pm$ 7,2)	0/48	1/48 (1 %)	4/48 (0,8 % $\pm$ 0,3)
Pt # 2	4/96 (0,8 % $\pm$ 0,2)	16/96 (1,6 % $\pm$ 1,2)	2/96 (0,6 % $\pm$ 0,02)	0/96	0/96	0/96
Pt # 3 DP $\beta$ 1*0201/2001 DQ $\beta$ 1*0303/0501 DR $\beta$ 1*0101/0701	10/96 (1,7 % $\pm$ 2,9)	5/96 (16,2 % $\pm$ 33,2)	4/96 (1,9 % $\pm$ 1,3)	0/96	0/96	0/96
	MELOE-1 <sub>2-21</sub>	MELOE-1 <sub>11-30</sub>	MELOE-1 <sub>22-46</sub>	MELOE-1 <sub>2-21</sub>	MELOE-1 <sub>11-30</sub>	MELOE-1 <sub>22-46</sub>
Pt # 4	0/48	9/48 (0,9 % $\pm$ 0,5)	0/48	1/48 (0,7 %)	0/48	0/48
Pt # 5	1/48 (0,6 %)	6/48 (1,5 % $\pm$ 1,1)	0/48	2/48 (0,7 % $\pm$ 0,1)	0/48	1/48 (0,8 %)
Pt # 6	0/48	5/48 (1,5 % $\pm$ 1,9)	0/48	0/48	0/48	0/48
Pt # 7	0/48	0/48	28/48 (2,9 % $\pm$ 3,5)	0/48	0/48	7/48 (1,5 % $\pm$ 0,7)

(continuación)

	Microcultivos que contienen linfocitos T CD4 específicos de MELOE-1					
	Respuestas Th1 (microcultivos positivos para IFN- $\gamma$ )			Respuestas Th2 (microcultivos positivos para IL4)		
	MELOE-1 <sub>2-21</sub>	MELOE-1 <sub>11-30</sub>	MELOE-1 <sub>22-46</sub>	MELOE-1 <sub>2-21</sub>	MELOE-1 <sub>11-30</sub>	MELOE-1 <sub>22-46</sub>
<b>Pt # 8</b>	0/48	2/48 (2,9 % $\pm$ 0,04)	1/48 (0,5 %)	0/48	0/48	1/48 (0,6 %)
<b>Pt # 9</b>	0/48	0/48	0/48	1/48 (0,6 %)	9/48 (0,6 % $\pm$ 0,09)	3/48 (0,7 % $\pm$ 0,15)

5 Las PBMC de pacientes con melanoma se estimularon con 10  $\mu$ M de MELOE-1. Después de 14 días, se evaluó la presencia de linfocitos T CD4 específicos para las diferentes regiones de MELOE-1 mediante la reestimulación de células con péptidos MELOE-1<sub>2-21</sub>, Los péptidos MELOE-1<sub>11-30</sub> y MELOE-1<sub>22-46</sub>, seguido de doble tinción CD4/IFN- $\gamma$  para la detección de respuestas Th1, y doble tinción CD4/IL4 para respuestas Th2. Entre paréntesis se indica el % medio de linfocitos T CD4 productores de citocina, en microcultivos positivos.

**Tabla IV:** Caracterización de TCR y perfil de citocinas de clones de linfocitos T CD4 específicos de MELOE-1

Clon de linfocitos T CD4 específico de MELOE-1 <sub>2-21</sub> (9C12-DQ $\beta$ 1*0202)		
<i>Cadena beta CDR3</i>		<i>Perfil de citocinas</i>
Cadena beta V	V $\beta$ 2.1	TNF <sup>alto</sup>
CDR3 beta	CSA SPDTHWGTDQ YFG	IFN <sup>alto</sup>
cadena beta J	J $\beta$ 2.3	IL2 <sup>alto</sup>
		GM-CSF <sup>alto</sup>
		IL4 <sup>alto</sup>
		IL5 <sup>bajo</sup>
		IL13 <sup>alto</sup>
		IL10 <sup>neg</sup>
Clon de linfocitos T CD4 específico de MELOE-1 <sub>11-30</sub> (1A5-DR $\beta$ 1*1101)		
Cadena beta V	ND	TNF <sup>alto</sup>
CDR3 beta	ND	IFN <sup>alto</sup>
cadena beta J	ND	IL2 <sup>alto</sup>
		GM-CSF <sup>alto</sup>
		IL4 <sup>bajo</sup>
		IL5 <sup>neg</sup>
		IL13 <sup>neg</sup>
		IL10 <sup>neg</sup>
Clon de linfocitos T CD4 específico de MELOE-1 <sub>11-30</sub> (5F9-DR $\beta$ 1*0101)		
Cadena beta V	ND	TNF <sup>alto</sup>
CDR3 beta	ND	IFN <sup>alto</sup>
cadena beta J	ND	IL2 <sup>bajo</sup>

(continuación)

Clon de linfocitos T CD4 específico de MELOE-1 <sub>2-21</sub> (9C12-DQβ1*0202)		
		GM-CSF <sup>alto</sup>
		IL4 <sup>alto</sup>
		IL5 <sup>neg</sup>
		IL13 <sup>alto</sup>
		IL10 <sup>neg</sup>
Clon de linfocitos T CD4 específico de MELOE-1 <sub>26-46</sub> (4E2-DQβ1*0201)		
Cadena beta V	Vβ2.1	TNF <sup>alto</sup>
CDR3 beta	CSA SGRRKFYEQ YFG	IFN <sup>alto</sup>
cadena beta J	Jβ 2.7	IL2 <sup>alto</sup>
		GM-CSF <sup>alto</sup>
		IL4 <sup>alto</sup>
		IL5 <sup>bajo</sup>
		IL13 <sup>alto</sup>
		IL10 <sup>neg</sup>

Los clones de linfocitos T CD4 se estimularon durante 5 horas en presencia de brefeldina A (10 µg/ml) con el péptido afín (10 µM) en un ensayo de presentación automática. Después de 5 horas de estimulación, las células se tiñeron con AcM anti-CD4 conjugado con APC, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se marcaron con AcM anticitocina conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo.

**Ejemplo:****Materiales y métodos****Células**

Se obtuvieron muestras de sangre de sujetos sanos y pacientes con melanoma, respectivamente, del Etablissement Français du Sang, Nantes, Francia y del departamento de oncodermatología, Hospital de Nantes, Francia. Las líneas celulares de melanoma y B-EBV se mantuvieron en RPMI 1640 (GIBCO) que contenía suero de ternera fetal (FCS, de sus siglas en inglés) al 10 %. Los linfocitos se cultivaron en suero humano (SH) RPMI 1640 al 8 % con 50 o 75 UI/ml de interleucina-2 recombinante (IL-2, Chiron, Francia) y 2 nM de L-Glutamina. Para experimentos con células dendríticas (CD), se usó RPMI complementado con 20 mg/ml de albúmina humana (LFB BIOMEDICAMENTS, Francia) para evitar la degradación de péptidos por las proteasas séricas.

**Reactivos**

Los anticuerpos se adquirieron de BD Biosciences-Francia o de Miltenyi Biotec, Francia. Las citocinas purificadas se compraron en CellGenix, Alemania. Los diferentes péptidos (Millegen, Francia, pureza > 85 %) utilizados en este estudio se describen en la Tabla I. Los monómeros HLA-A\*0201/MELOE-1<sub>36-44</sub> fueron generados por la instalación de proteínas recombinantes de nuestro instituto (SFR 26).

**Generación y carga de células dendríticas**

Los monocitos se purificaron a partir de PBMC de donantes sanos mediante un kit de enriquecimiento de CD14, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (Stem Cell, Francia). Las células dendríticas inmaduras (CDi) se generaron mediante el cultivo de monocitos en RPMI complementado con 20 mg/ml de albúmina humana, 1000 UI/ml de GM-CSF y 200 UI/ml de IL-4 durante 5 días. Luego, se pulsaron CDi con la proteína MELOE-1 (1 µM) completa o el Melan-A<sub>16-40</sub> A27L modificado como control negativo (1 µM) y se dejaron madurar con 20 ng/ml de TNF-a y 50 µg/ml de Polil:C durante 4 horas a 37 °C. Finalmente se fijaron durante 1 minuto con PBS/glutaraldehído al 0,015 %. Alternativamente, las CDi se dejaron madurar primero, se fijaron y luego se pulsaron con antígenos a la misma concentración.

Estimulación de linfocitos T específicos de MELOE-1

Se cultivaron PBMC de donantes sanos o pacientes con melanoma ( $2 \cdot 10^5$  células/pocillo) durante 14 días con  $10 \mu\text{M}$  de antígeno completo MELOE-1 (46 aminoácidos) en medio RPMI complementado con SH al 8 %, 50 UI/ml de rIL-2 (Chiron, Francia) y L-Glutamina, en multiplacas de 96 pocillos. Los microcultivos se reestimularon luego individualmente con cada péptido superpuesto (MELOE-1<sub>2-21</sub>, MELOE-1<sub>11-30</sub>, MELOE-1<sub>18-37</sub>, MELOE-1<sub>26-46</sub> o MELOE-1<sub>22-46</sub> para pacientes con melanoma) en presencia de  $10 \mu\text{g/ml}$  de brefeldina A durante 5 horas y el porcentaje de linfocitos T específicos para CD4+ se evaluó mediante tinción intracelular de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-4. Se incluyó un control negativo sin péptido en todos los experimentos.

Alternativamente, los clones de linfocitos T CD4+ específicos de MELOE-1 se estimularon por CD autólogas cargadas y maduras con MELOE-1 en una relación 1:1.

Clonación de linfocitos T y caracterización de TCR

Los cultivos policlonales que contienen linfocitos T CD4+ específicos se clonaron mediante dilución limitante como se describió previamente (Gervois N. et al., 2000). Después de 2 semanas, se comprobó la especificidad de péptido de cada clon mediante un ensayo de producción de TNF. Para la secuenciación de TCR, se extrajo el ARN de  $5 \cdot 10^6$  clones de linfocitos T con el reactivo RNable (Eurobio, Francia) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las transcripciones inversas, las amplificaciones por PCR y la secuenciación se realizaron como se describe (Davodeau F. et al, 2001). Se utilizó la nomenclatura TCR establecida por Arden *et al.* (Arden et al., 1995).

Ensayo de producción de TNF

Los clones de linfocitos T CD4+ se cultivaron durante 5 horas a  $37^\circ\text{C}$  en presencia del péptido 20-mer reconocido. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se midió el TNF en un ensayo biológico usando citotoxicidad contra el clon 13 de WEHI 164 (Espevik T. et al., 1986).

Tinción intracelular de citocinas

Los linfocitos se estimularon durante 5 horas en presencia de brefeldina A ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) con péptido solo ( $10 \mu\text{M}$ ) en un ensayo de presentación automática o con células de melanoma que expresan B-EBV o HLA-clase II pulsadas 2 horas con el péptido afín, en una proporción de 1:2. En algunos experimentos, el AcM de bloqueo contra HLA-DP (clon B7.21 del Dr. Charron, UMR940, Paris), HLA-DQ (clon SPVL3, Beckman Coulter) o HLA-DR (clon L243, BD Biosciences) se añadió a una concentración de  $12,5 \mu\text{g/ml}$ . Las células se tiñeron luego con AcM anti-CD4 conjugado con APC, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se marcaron con AcM anticitocina conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático GraphPad Prism®. Se utilizaron gráficos de barras para comparar las frecuencias de linfocitos T específicos para péptidos procedentes de MELOE-1, en todos los donantes y pacientes, y se analizaron mediante una tabla de contingencia seguida de una prueba exacta de Fisher. Se hicieron gráficos de puntos de dispersión para comparar el porcentaje de células positivas para TNF $\alpha$  entre microcultivos positivos y se analizaron con una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis seguida de una prueba posterior de Dunns).

**RESULTADOS**

Frecuencia y distribución de respuestas CD4 específicas de MELOE-1 en PBMC de donantes sanos estimuladas con antígeno MELOE-1

El propósito fue buscar la existencia de epítomos auxiliares de clase II a lo largo de la secuencia MELOE-1 (SEQ ID NO: 20), para documentar la inmunogenicidad de las diferentes regiones de este antígeno de melanoma. Se estimularon  $2 \cdot 10^7$  PBMC de siete donantes sanos con el antígeno completo MELOE-1 y se probaron, después de un período de cultivo de 14 días, la presencia de linfocitos T CD4 específicos para cada región de la proteína. Los microcultivos se seleccionaron para la producción de TNF $\alpha$  mediante linfocitos T CD4+, después de la reestimulación con cuatro péptidos superpuestos procedentes de MELOE-1 (Tabla I), en un ensayo de presentación automática. Como se muestra en la tabla II, todos los donantes exhibieron respuestas de CD4 contra al menos 1 de 4 péptidos superpuestos. Se detectaron respuestas contra la región N-terminal de MELOE-1 (2-21) en 6/7 donantes, con frecuencias bastante bajas (del 1 al 9 % de los microcultivos positivos que contienen entre del 0,6 al 5,6 % de los linfocitos T CD4 productores de TNF $\alpha$ ), excepto en el donante sano HD28, que exhibió un 62 % de microcultivos positivos. La región 11-30 parece especialmente inmunogénica, con respuestas específicas de CD4 detectadas en cada donante analizado (del 2 al 48 % de los microcultivos positivos que contienen entre el 0,7 y el 24 % de las linfocitos T CD4 productores de TNF $\alpha$ ), y con frecuencias muy altas en tres donantes (HD17, HD24 y HD28). Por el contrario, la región central 18-37, que contiene un epítomo restringido por DR11 ya descrito (24-37) ubicado justo al

final de este péptido de 20 meros (Rogel et al., 2011), indujo respuestas específicas en microcultivos procedentes de solo 2/7 donantes (HD9 y HD17, ambos expresando el elemento DR11). En estos dos donantes, Se detectó un 6 y 7 % de microcultivos positivos, que contienen entre un 0,6 y 3,7 % de linfocitos T CD4 productores de TNF $\alpha$ . Finalmente, la región C-terminal (26-46), que contiene un epítipo restringido por DQ6 ya descrito (Rogel et al., 2011), fue reconocida por microcultivos estimulados de 4 de 7 donantes (no todos expresan el elemento DQ6), con frecuencias que varían del 2 al 16 % de los microcultivos que contienen entre un 0,5 y un 16 % de los linfocitos T CD4 productores de TNF $\alpha$ . En general, la frecuencia de los microcultivos positivos para MELOE-1<sub>11-30</sub> fue significativamente mayor que la frecuencia de los microcultivos específicos para las otras tres regiones de MELOE-1 (Figura 1B) ( $p < 0,0001$ ). Las dos regiones terminales (2-21 y 26-46) fueron equivalentes en términos de frecuencias de microcultivos positivos, y estas dos regiones indujeron significativamente más respuestas que la región central 18-37 (Figura 1A). Sin embargo, las fracciones medias de los linfocitos T reactivos CD4 inducidos en microcultivos positivos no fueron significativamente diferentes de una región a otra (Figura 1B).

#### Frecuencia, distribución y perfil Th de respuestas CD4 específicas de MELOE-1 en PBMC de pacientes con melanoma estimuladas con antígeno MELOE-1

Para confirmar la inmunogenicidad de cada región MELOE-1 en pacientes con melanoma, se estimularon PBMC de pacientes con melanoma con la proteína completa MELOE-1 y se probó la reactividad de los linfocitos estimulados hacia las tres regiones más inmunogénicas: 2-21, 11-30, y 22-46. Para este estudio, en lugar de exponer los microcultivos con el péptido 18-37, que parecía pobremente inmunogénico, se extendió a la región C-terminal de 26-46 a 22-46, para detectar también respuestas al epítipo restringido por HLA-DR11 previamente descrito (24-37). De hecho, la ubicación de este epítipo justo al final del péptido 18-37 podría ser perjudicial para la detección de respuestas específicas en contextos DR adicionales, y previamente se demostró que los linfocitos T CD4 específicos para el epítipo MELOE-1<sub>24-36</sub> fueron inducidas eficazmente por la estimulación del péptido 22-46 (Rogel et al., 2011). Se probó la inducción de respuestas específicas de CD4 a partir de PBMC estimuladas por MELOE-1 de 10 pacientes con melanoma. Se documentaron respuestas CD4 específicas para la región central de MELOE-1 (11-30) para 7/9 pacientes, mientras que las respuestas específicas para MELOE-1<sub>2-21</sub> y MELOE-1<sub>22-46</sub> se detectaron respectivamente en 4/9 y 5/9 pacientes (Tabla III). Estas respuestas fueron principalmente respuestas Th1 (producción de IFN- $\gamma$ ), mientras que se detectaron respuestas Th2 menos frecuentes específicas para las tres regiones de MELOE-1 en 3/9 pacientes para MELOE-1<sub>2-21</sub>, 2/9 pacientes para MELOE-1<sub>11-30</sub> y 5/9 pacientes para MELOE-1<sub>22-46</sub> (Tabla III). Considerando las diversas regiones de MELOE-1, las respuestas Th1 específicas para la región N-terminal de MELOE-1 (2-21) fueron significativamente menos frecuentes que las específicas para la región central ( $p < 0,0001$ ) y la región C-terminal ( $p = 0,0001$ ), con respectivamente un 3,3 %, 10,8 % y 9,6 % de 576 microcultivos probados (Figura 2A). Con respecto a las respuestas Th2, mucho menos frecuentes, la región C-terminal pareció inducir con mayor frecuencia el crecimiento de linfocitos T CD4 productores de IL-4 que las otras dos regiones (Figura 2A). Como se observó para los donantes sanos, incluso si las frecuencias eran diferentes, la fracción media de linfocitos T reactivos (Th1 y Th2) inducidos en microcultivos positivos no fue significativamente diferente de una región a otra (Figura 2B). En resumen, la estimulación de las PBMC del paciente con MELOE-1 indujo respuestas Th1 específicas para diversos epítopos ubicados a lo largo de la secuencia de proteínas, y entre las diferentes regiones, la región central (11-30) y la región C-terminal (22-46) parecían ser especialmente inmunogénicas en términos de frecuencia de respuestas.

#### Producción y caracterización de clones de linfocitos T CD4 específicos para las diferentes regiones de MELOE-1

Para caracterizar formalmente los epítopos reconocidos, se obtuvieron clones de linfocitos T CD4 específicos para cada región de MELOE-1 mediante la limitación de la dilución, a partir de microcultivos de donantes sanos o pacientes con melanoma, que contenían al menos un 0,5 % de linfocitos T CD4 específicos. Se lograron obtener clones de linfocitos T específicos de CD4 de microcultivos HD17, HD22, HD25 y Pt # 3, que fueron reactivos contra MELOE-1<sub>2-21</sub> (HD22), MELOE-1<sub>11-30</sub> (HD17 y Pt#3) y MELOE-1<sub>26-46</sub> (HD25). De cada experimento de clonación, se obtuvieron entre uno y diez clones de linfocitos T CD4 reactivos, que resultaron ser el mismo clonotipo después de la secuenciación de CDR3 $\beta$  (Tabla IV). Se usó un solo clon de linfocitos T CD4 para cada especificidad para experimentos adicionales. La restricción de HLA se determinó para cada clon de linfocitos T, primero mediante el uso de anticuerpos monoclonales bloqueadores de HLA-clase II (Figura 3, panel superior), y luego mediante la prueba del reconocimiento de líneas celulares B-EBV coincidentes con HLA cargadas con cada péptido largo reconocido (Figura 3, panel central). Los dos clones de linfocitos T llamados 9C12 y 4E2, procedentes de HD22 y HD25 y específicos para MELOE-1<sub>2-21</sub> y MELOE-1<sub>26-46</sub> fueron restringidos por las moléculas HLA-DQ $\beta$ 1\*0202 y DQ $\beta$ 1\*0201 respectivamente. Como, estos dos donantes eran homocigotos para el locus HLA-DQ, se probó una única línea de células B-EBV coincidentes con HLA-DQ para confirmar la restricción de HLA de estos dos clones de linfocitos T CD4. Como se muestra en la figura 3 (panel superior), los otros dos clones de linfocitos T 1A5 y 5F9 reconocieron la región 11-30 de MELOE-1, en un contexto HLA-DR. El uso de líneas celulares B-EBV coincidentes con HLA permitió precisar que el clon de linfocitos T 1A5 estaba restringido por la molécula HLA-DR $\beta$ 1\*1101 y el clon de linfocitos T 5F9 por la molécula HLA-DR $\beta$ 1\*0101.

Además, se probó la reactividad de estos clones de linfocitos T CD4 contra líneas celulares de melanoma coincidentes con HLA positivas para la expresión de *meloe*, mediante análisis qPCR. Todas las líneas celulares de melanoma probadas expresaron HLA-DQ y DR en la superficie celular. Todos los clones de linfocitos T fueron

reactivos contra las líneas celulares de melanoma coincidente con HLA cuando se cargaron con el péptido afín (Figura 3, panel inferior, barras negras). Los dos clones de linfocitos T restringidos a DQ2 fueron reactivos contra las líneas celulares de melanoma DQβ1\*0201 y 0202 cargadas con péptido. En ausencia de péptido, solo el clon de linfocitos T restringido por 4E2 DQ β1\*0201 pudo reconocer la línea celular de melanoma M77 no cargada (también DQβ1\*0201), pero no la línea celular de melanoma DQβ1\*0202, M88. De manera similar, el clon 5F9 de linfocitos T restringido por DR1 también reconoció una de la línea celular de melanoma DRβ1\*0101, en ausencia de péptido exógeno (M101).

También se documentó el perfil de T auxiliar de cada clon de linfocitos T, mediante la estimulación de los clones de linfocitos T CD4 con el péptido afín y el análisis de la producción de citocinas. Todos los clones expresaron citocinas Th1 (TNFα, IFNγ, IL2 y GM-CSF). Por el contrario, estos clones difieren en su expresión de citocinas Th2. De hecho, los dos clones de linfocitos T restringidos a DQ2 (9C12 y 4E2) y el restringido por DR1 (5F9) también expresan fuertemente dos citocinas Th2 (IL4 e IL13), mientras que el clon de linfocitos T restringido por DR11 solo expresó débilmente IL4 (Tabla IV). Ninguna de los linfocitos T CD4 expresa IL10 o IL5 a un nivel significativo.

#### Procesamiento de los epítomos reconocidos a partir de CD autólogas cargadas con antígeno MELOE-1

La estimulación inicial de PBMC se llevó a cabo con el antígeno completo MELOE-1 y, por lo tanto, se supone que las respuestas de los linfocitos T CD4 se generaron contra los péptidos procesados de manera natural por los monocitos. Sin embargo, no se podía excluir formalmente que el período de cultivo de 14 días generó artificialmente epítomos de clase II más cortos que provocaron respuestas de linfocitos T CD4. Por lo tanto, seguía siendo crucial evaluar que todos estos nuevos epítomos fueron procesados de manera natural por células dendríticas autólogas cargadas con proteína completa MELOE-1, en medio sin suero. Con este fin, se cargaron CDi autólogas con 1 μM de antígeno MELOE-1 en medio sin suero, en presencia de agentes de maduración, y se fijaron estas CD antes de la estimulación de los clones de linfocitos T específicos de CD4. En estas condiciones, los cuatro clones de linfocitos T fueron reactivos frente a CD autólogas cargadas con MELOE-1 (Figura 4, panel izquierdo), mientras que no se pudo detectar ninguna reactividad de clones de linfocitos T CD4 a CD cargadas con un péptido largo irrelevante, sintetizado en las mismas condiciones (Melan-A<sub>16-40L</sub>).

Como control adicional, se cargaron CD autólogas con MELOE-1 después de la fijación de las CD, y se pudo observar solo un reconocimiento débil por clones de linfocitos T CD4 específicos, lo que indica que solo una pequeña fracción de la proteína se había degradado externamente en péptidos más cortos (Figura 4, panel derecho). Por lo tanto, los cuatro nuevos epítomos identificados mediante la estimulación de PBMC, se procesan de manera natural a partir del antígeno MELOE-1.

#### Caracterización de los epítomos mínimos reconocidos

Los clones de linfocitos T fueron reactivos contra péptidos de 20 meros que probablemente no son los péptidos exactos procesados de manera natural. Para identificar formalmente los epítomos mínimos reconocidos, se probaron péptidos más cortos procedentes de cada una de las regiones reconocidas por MELOE-1, elegida en base a la secuencia de péptidos centrales que supuestamente deben ser reconocidos por los clones de linfocitos T (indicado en negrita en la Figura 5).

Tres péptidos más cortos fueron mejor reconocidos por el clon de linfocitos T 9C12 restringido por DQ2, el más corto fue MELOE-1<sub>7-19</sub> (13-mer), reconocido con una CE<sub>50</sub> de 100 nM. La eliminación de los dos aminoácidos en el extremo C reduce en gran medida el reconocimiento de clones de linfocitos T. El otro clon de linfocitos T restringido por DQ2 (4E2) reconoció mejor un péptido de 14 mer (31-44) también con una CE<sub>50</sub> de 100 nM, y también reconoció en menor medida el epítomo 32-44 (Figura 5) descrito anteriormente en el contexto de HLA-DQβ1\*0603 (Rogel et al., 2011). Con respecto a los clones de linfocitos T restringidos a DR, los péptidos más cortos óptimos fueron péptidos de 13 mer, MELOE-1<sub>15-27</sub> para el clon 1A5 de linfocitos T restringido por DRβ1\*1101 (CE<sub>50</sub> = 100 nM) y MELOE-1<sub>11-23</sub> o MELOE-1<sub>12-24</sub> para el restringido por DRβ1\*0101 (Figura 5). No obstante, todos estos clones reconocieron una serie de péptidos acortados, por lo que no se puede evaluar formalmente que los más cortos serán los péptidos exactos que se presentan de manera natural en las moléculas de clase II.

#### **REFERENCIAS:**

A lo largo de la presente solicitud, varias referencias describen el estado de la materia al que pertenece esta invención.

Arden B, Clark SP, Kabelitz D, y Mak TW Human T-cell receptor variable gene segment families. Immunogenetics 1995; 42: 455-500.

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, y Heath WR Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. Nature 1998; 393: 478-80.

Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, Offringa R, y van der Burg SH CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. J Immunol 2007; 179: 5033-40.

Chauvin JM, Larrieu P, Sarraayrouse G, Prevost-Blondel A, Lengagne R, Desfrancois J, et al. HLA Anchor

Optimization of the Melan-A-HLA-A2 Epitope within a Long Peptide Is Required for Efficient Cross-Priming of Human Tumor-Reactive T Cells. *J Immunol* 2012; 188: 2102-10.

Davodeau F, Difilippantonio M, Roldan E, Malissen M, Casanova JL, Couedel C, et al. The tight interallelic positional coincidence that distinguishes T-cell receptor  $\alpha$  usage does not result from homologous chromosomal pairing during  $\alpha$  rearrangement. *EMBO J* 2001; 20: 4717-29.

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

Gervois N, Labarriere N, Le Guiner S, Pandolfino MC, Fonteneau JF, Guilloux Y, et al. High avidity melanoma-reactive cytotoxic T lymphocytes are efficiently induced from peripheral blood lymphocytes on stimulation by peptide-pulsed melanoma cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1459-67.

Godet Y, Desfrancois J, Vignard V, Schadendorf D, Khammari A, Dreno B, et al. Frequent occurrence of high affinity T cells against MELOE-1 makes this antigen an attractive target for melanoma immunotherapy. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1786-94.

Godet Y, Moreau-Aubry A, Guilloux Y, Vignard V, Khammari A, Dreno B, et al. MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *J Exp Med* 2008; 205: 2673-82.

Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 2008; 358: 2698-703.

Fayolle C, Deriaud E, y Leclerc C *In vivo* induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4+ T cell help. *J Immunol* 1991; 147: 4069-73.

Friedman KM, Prieto PA, Devillier LE, Gross CA, Yang JC, Wunderlich JR, et al. Tumor-specific CD4+ Melanoma Tumor-infiltrating Lymphocytes. *J Immunother* 2012.

Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 2009; 361: 1838-47.

Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Zeng G, Dudley M, y Rosenberg SA Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol* 2002; 169: 6036-47.

Rogel A, Vignard V, Bobinet M, Labarriere N, y Lang F A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A\*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 327-37.

Rosenberg SA, Yang JC, y Restifo NP Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10: 909-15.

Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364: 2119-27.

Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, et al. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1143-8.

Speetjens FM, Kuppen PJ, Welters MJ, Essahsah F, Voet van den Brink AM, Lantrua MG, et al. Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1086-95.

Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, y Kast WM Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1996; 93: 7855-60.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, y Smyth MJ Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 235-71.

Welters MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, et al. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 178-87.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
- <120> NUEVO PÉPTIDO ANTIGENO DE MELANOMA Y USOS DEL MISMO
- <130> BIO12148 LABARRIERE
- <160> 37
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> péptido

ES 2 750 367 T3

<400> 1

Ser Cys Val Gly Tyr Pro Asp Glu Ala Thr Ser Arg Glu Gln Phe Leu  
 1 5 10 15

Pro Ser Glu Cys  
 20

5 <210> 2  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> péptido

<400> 2

Val Gly Tyr Pro Asp Glu Ala Thr Ser Arg Glu Gln Phe Leu Pro Ser  
 1 5 10 15

15 <210> 3  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> péptido

25 <400> 3

Val Gly Tyr Pro Asp Glu Ala Thr Ser Arg Glu Gln Phe Leu  
 1 5 10

30 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> péptido

<400> 4

Gly Tyr Pro Asp Glu Ala Thr Ser Arg Glu Gln Phe Leu Pro Ser  
 1 5 10 15

40 <210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> péptido

50 <400> 5

Pro Asp Glu Ala Thr Ser Arg Glu Gln Phe Leu Pro Ser  
 1 5 10

ES 2 750 367 T3

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido  
 10 <400> 6  
  
 Pro Trp His Pro Ser Glu Arg Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys  
 1 5 10 15  
  
 Trp Pro Ala Ser Leu  
 20  
  
 <210> 7  
 15 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> péptido  
  
 <400> 7  
  
 Arg Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala Ser  
 1 5 10  
 25  
  
 <210> 8  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido  
  
 <400> 8  
 35  
  
 Arg Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 9  
 <211> 14  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido  
 45  
 <400> 9  
  
 Glu Arg Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50

ES 2 750 367 T3

<220>  
<223> péptido

5 <400> 10

Thr Ser Arg Glu Gln Phe Leu Pro Ser Glu Gly Ala Ala Cys Pro Pro  
1 5 10 15

Trp His Pro Ser  
20

10 <210> 11  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> péptido

<400> 11

Arg Glu Gln Phe Leu Pro Ser Glu Gly Ala Ala Cys Pro Pro Trp  
1 5 10 15

20 <210> 12  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> péptido

30 <400> 12

Glu Gln Phe Leu Pro Ser Glu Gly Ala Ala Cys Pro Pro Trp

1 5 10

35 <210> 13  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> péptido

<400> 13

Gln Phe Leu Pro Ser Glu Gly Ala Ala Cys Pro Pro Trp  
1 5 10

45 <210> 14  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>

ES 2 750 367 T3

<223> péptido

<400> 14

Thr Ser Arg Glu Gln Phe Leu Pro Ser Glu Gly Ala Ala  
1 5 10

5

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 15

Ser Arg Glu Gln Phe Leu Pro Ser Glu Gly Ala Ala Cys  
1 5 10

20 <210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido

<400> 16

Pro Ser Glu Gly Ala Ala Cys Pro Pro Trp His Pro Ser Glu Arg Ile  
1 5 10 15

Ser Ser Thr Leu  
20

30

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> péptido

<400> 17

40

Ala Ala Cys Pro Pro Trp His Pro Ser Glu Arg Ile Ser Ser Thr Leu  
1 5 10 15

Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala Ser Leu  
20 25

45 <210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 750 367 T3

<223> péptido

<400> 18

Cys Pro Pro Trp His Pro Ser Glu Arg Ile Ser Ser Thr Leu  
1 5 10

5

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 19

Cys Pro Pro Trp His Pro Ser Glu Arg Ile Ser Ser Thr  
1 5 10

20

<210> 20

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido

<400> 20

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

30

Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala Ser Leu  
35 40 45

<210> 21

<211> 25

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> péptido

<400> 21

Gly His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Leu Ala Gly Ile Gly  
1 5 10 15

Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu  
20 25

45 <210> 22

ES 2 750 367 T3

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> péptido

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
10 <222> (2) .. (2)  
<223> X es L, M, V, I o Q

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
15 <222> (9) .. (9)  
<223> X es A, V o L

<400> 22

20 **Thr Xaa Asn Asp Glu Cys Trp Pro Xaa**  
**1 5**

<210> 23  
<211> 9  
<212> PRT  
25 <213> Artificial

<220>  
<223> péptido

30 <400> 23

**Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala**  
**1 5**

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> Artificial

<220>  
40 <223> péptido

<400> 24

**Thr Met Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala**  
**1 5**

45 <210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> péptido

55 <400> 25

ES 2 750 367 T3

Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala  
1 5

5 <210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> péptido  
<400> 26

Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala  
1 5

15 <210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> péptido  
<400> 27

Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala  
1 5

25 <210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> péptido  
35 <400> 28

Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val  
1 5

40 <210> 29  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> péptido  
<400> 29

Thr Met Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val  
1 5

50 <210> 30

ES 2 750 367 T3

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial  
5 <220>  
<223> péptido  
<400> 30

Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val  
1 5

10  
<210> 31  
<211> 9  
<212> PRT  
15 <213> Artificial  
<220>  
<223> péptido  
20 <400> 31

Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val  
1 5

25 <210> 32  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial  
30 <220>  
<223> péptido  
<400> 32

Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val  
1 5

35 <210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
40 <213> Artificial  
<220>  
<223> péptido  
45 <400> 33

Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
1 5

50 <210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial  
55 <220>  
<223> péptido

ES 2 750 367 T3

<400> 34

Thr Met Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
1 5

5 <210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> péptido

<400> 35

Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
1 5

15 <210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> péptido

25 <400> 36

Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
1 5

30 <210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> péptido

<400> 37

Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
1 5

40

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido antigénico de melanoma que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en donde dicho péptido es una secuencia de aminoácidos de menos de 20 aminoácidos de longitud, para su uso en la prevención o en el tratamiento de melanoma en un paciente.
2. El péptido antigénico de melanoma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido es una secuencia de aminoácidos de menos de 15 aminoácidos de longitud, o en donde dicho péptido antigénico de melanoma consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 11.
3. Una proteína de fusión que comprende el péptido antigénico de melanoma como se define en la reivindicación 1 o 2 y un péptido antigénico de melanoma que comprende el motivo de aminoácido:
- TX<sub>2</sub>NDECWPX<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 23)
- en donde X<sub>2</sub> es leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X<sub>9</sub> es alanina, valina o leucina, para su uso en la prevención o en el tratamiento de melanoma en un paciente.
4. El péptido antigénico de melanoma o la proteína de fusión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el paciente se genotipa con alelos HLA-DRβ1\*1101 o HLA-DRβ1\*0101.
5. Un linfocito T que reconoce específicamente el péptido antigénico de melanoma como se define en la reivindicación 1 o 2, o el péptido antigénico de melanoma como se define en la reivindicación 1 o 2 comprendido en la proteína de fusión como se define en la reivindicación 3, para su uso en la prevención o en el tratamiento de melanoma en un paciente.
6. El linfocito T para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho linfocito T se debe volver a administrar al paciente.
7. Un método para producir linfocitos T como se define en la reivindicación 5, comprendiendo dicho método las etapas de:
- (a) estimular PBMC, o linfocitos infiltrantes de tumores, obtenidos de un paciente, con al menos un péptido antigénico de melanoma como se define en la reivindicación 1 o 2 o la proteína de fusión como se define en la reivindicación 3,
- (b) enriquecer la población de linfocitos T específicos para el péptido(s) antigénico de melanoma utilizado en (a), y
- c) opcionalmente, clonar dicha población de linfocitos T específicos para el péptido(s) antigénico de melanoma utilizado en (a).
8. Un péptido antigénico de melanoma que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en donde dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 15 aminoácidos de longitud, o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 11.
9. El péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho péptido consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.
10. Una proteína de fusión que comprende el péptido antigénico de melanoma como se define en la reivindicación 8 o 9 y un péptido antigénico de melanoma que comprende el motivo de aminoácido:
- TX<sub>2</sub>NDECWPX<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 23)
- en donde X<sub>2</sub> es leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X<sub>9</sub> es alanina, valina o leucina.
11. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 o la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Un anticuerpo o fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une al péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.
15. Una composición inmunizante que comprende:

- 5
- (a) al menos un péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, o
  - (b) al menos una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 10, o
  - (c) al menos una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 o
  - (d) al menos un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 12, o
  - (e) al menos una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 13, o
  - (f) al menos un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14.

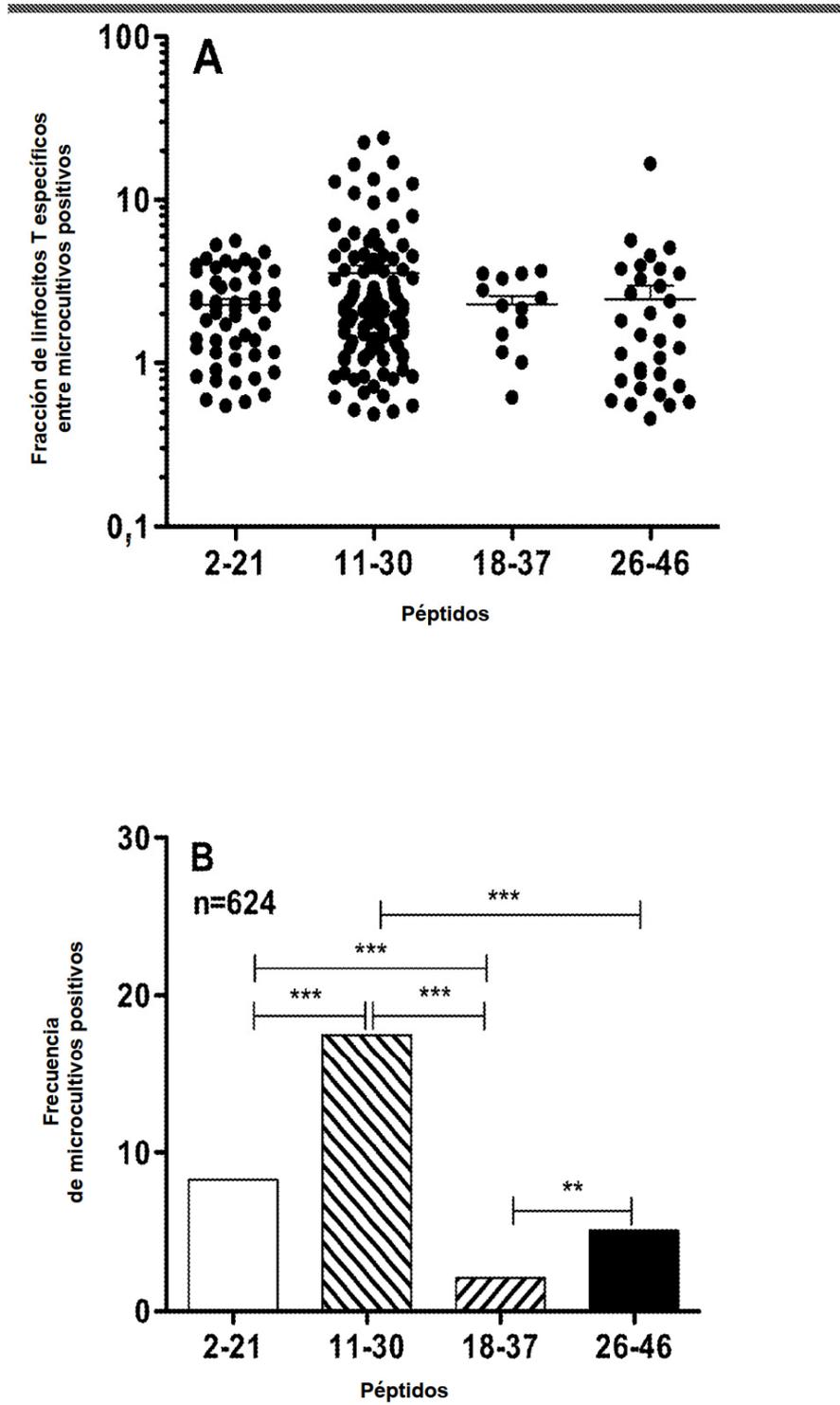


Figura 1

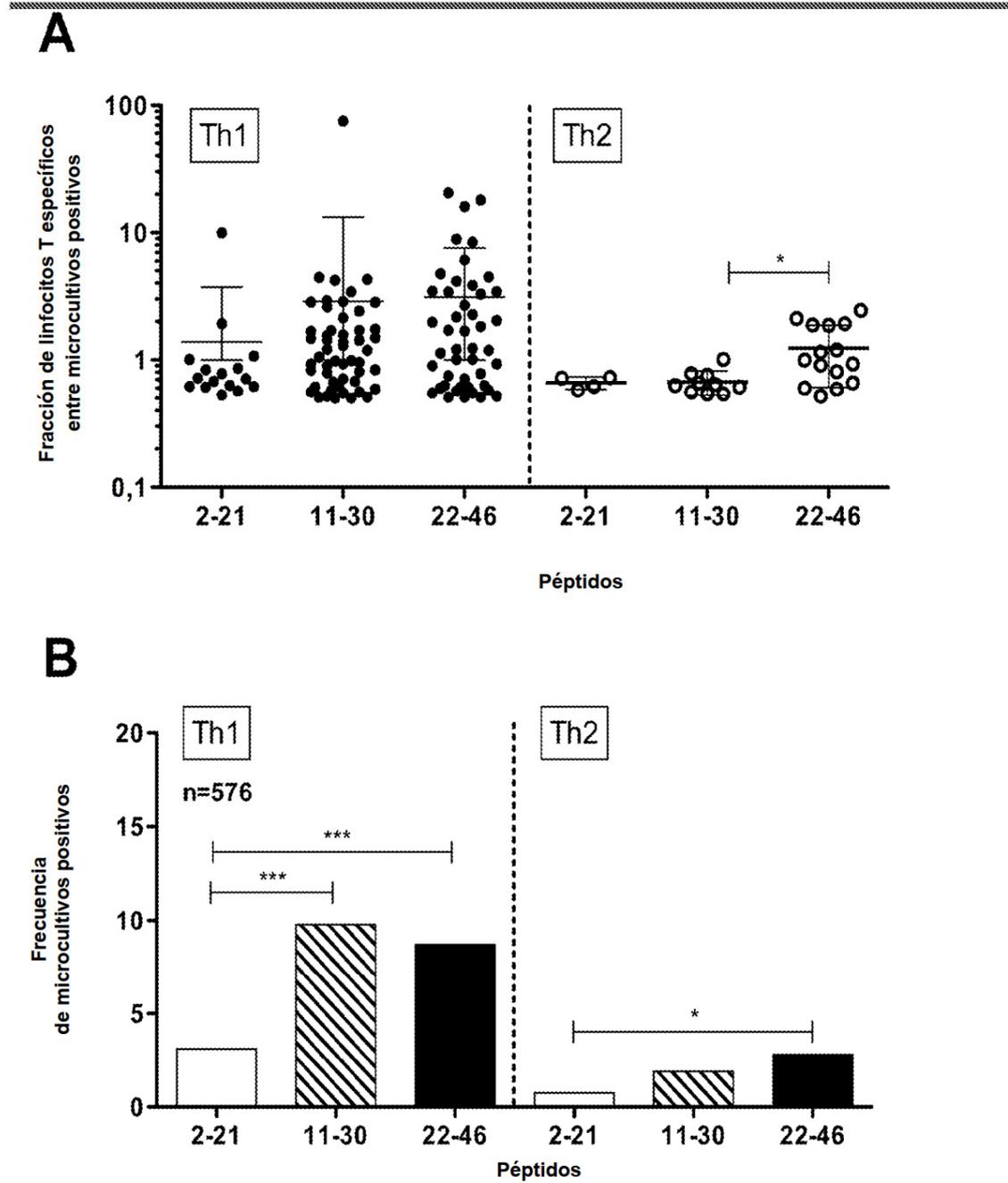


Figura 2

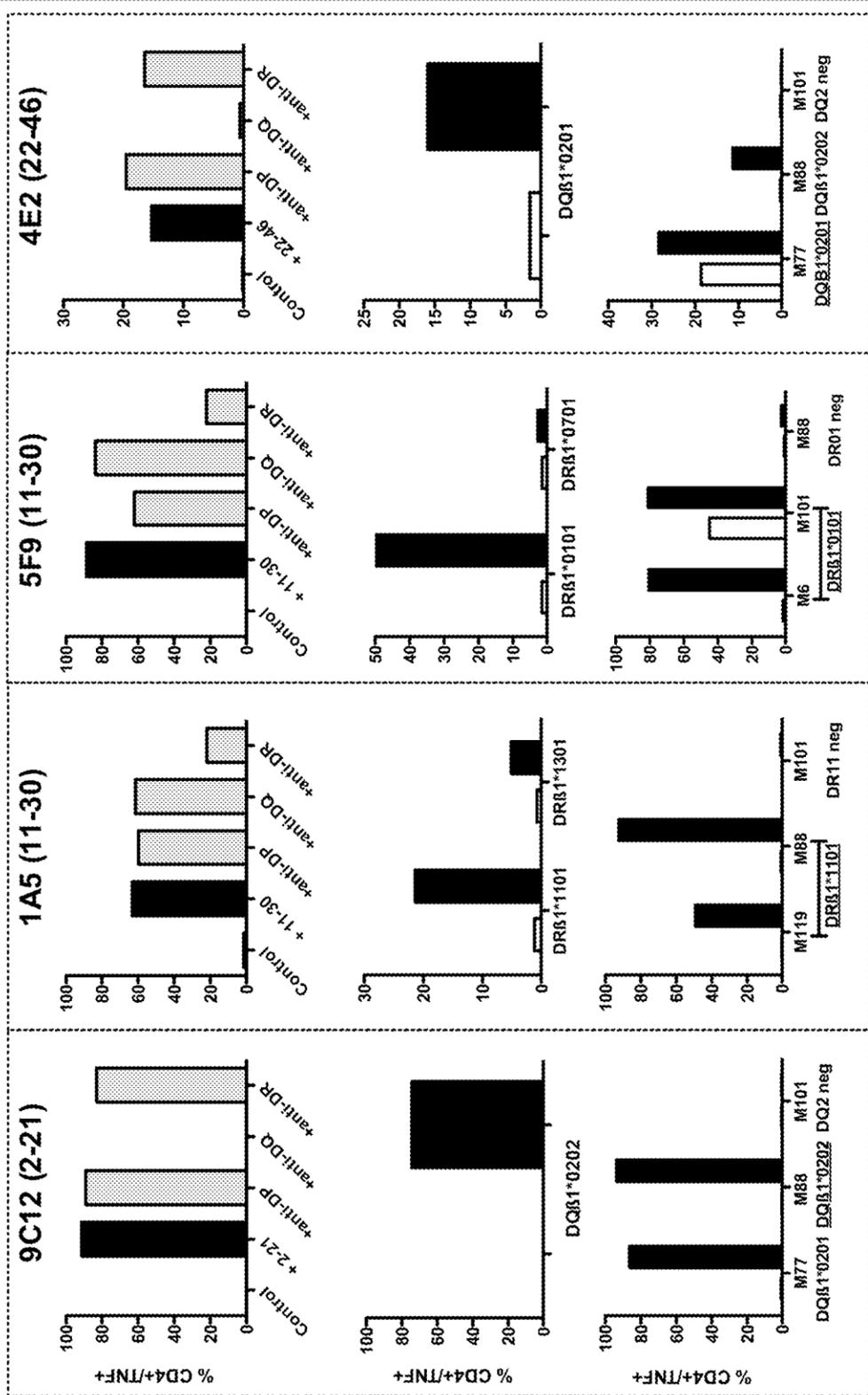


Figura 3

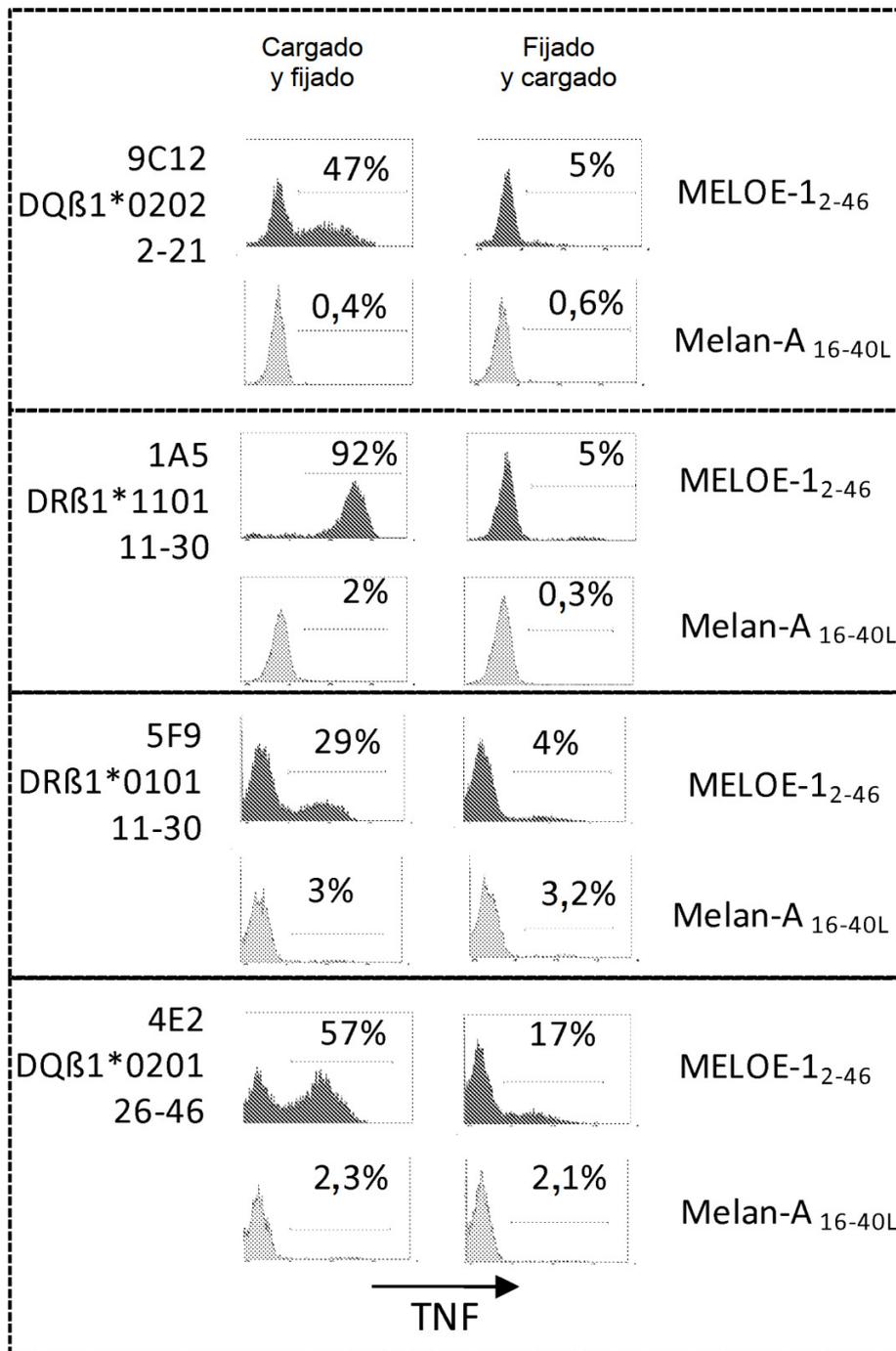


Figura 4

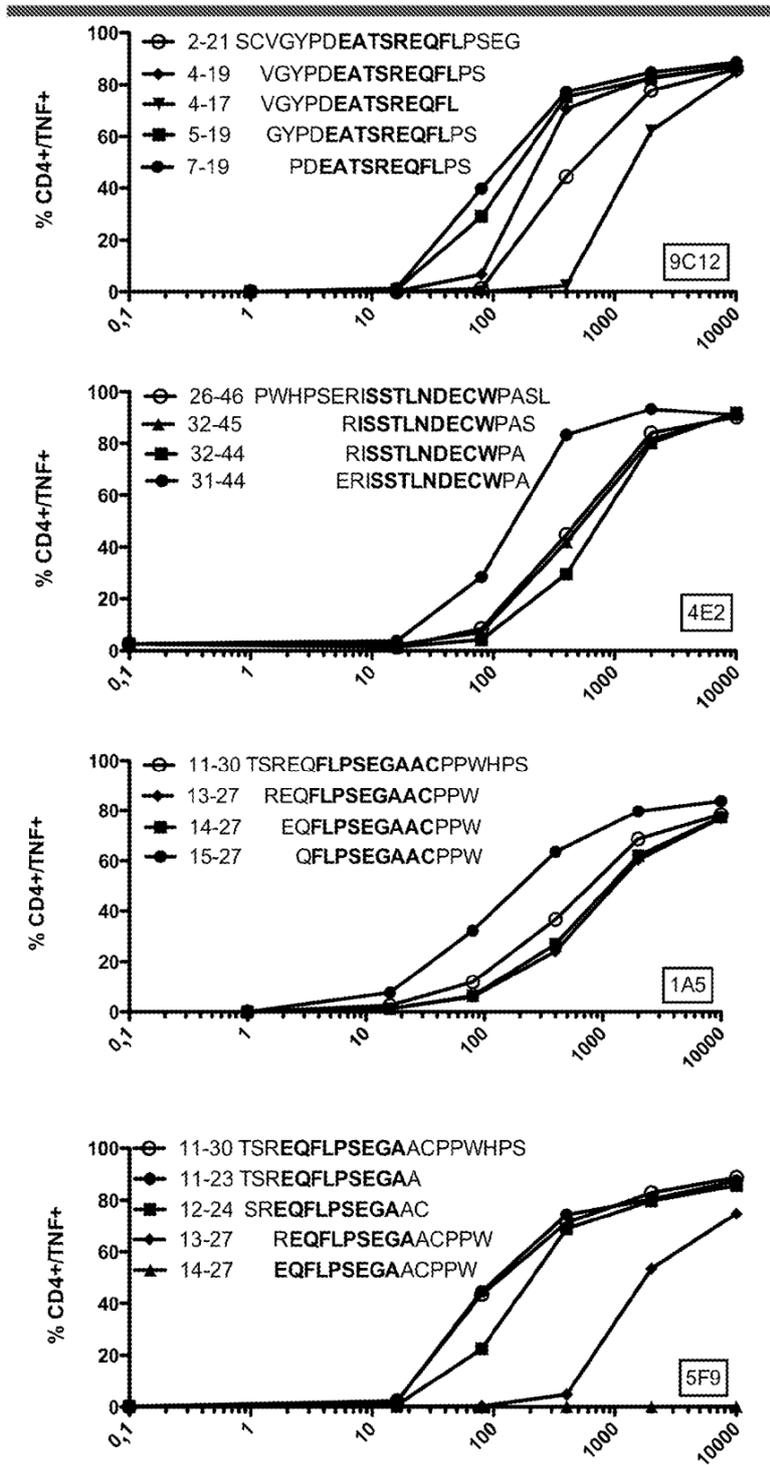


Figura 5