

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 392**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2012 PCT/IB2012/001310**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13175256**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2012 E 12761796 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2852611**

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:  
**08.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LABARRIERE, NATHALIE;**  
**LANG, FRANÇOIS;**  
**BOBINET, MATHILDE y**  
**ROGEL, ANNE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 753 392 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 del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 o una variante con función conservada de las mismas. 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 de melanoma en pacientes.

**Estado de la técnica**

15 En las respuestas inmunitarias antineoplásicas, los linfocitos T citotóxicos (CTL) 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 previas usan péptidos restringidos a HLA de clase I derivados de antígenos tumorales para estimular las respuestas de CTL. Sin embargo, el impacto clínico de las vacunas contra el cáncer basadas en péptido sigue siendo moderado, aunque una vacunación con péptido derivado de gp100 reciente demostró aumento de 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 usadas hasta ahora puede explicar este fracaso. En particular, los péptidos epitópicos cortos, podrían inducir la extinción de respuestas de CTL 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 auxiliares T 1 (Th1) CD4+ reactivos al tumor producen varias citocinas (tales como IFN- $\gamma$ , TNF-a e IL-2) esenciales para la inducción de inmunidad mediada por células contra los 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, lo que enfatiza la función de estas células en la inmunovigilancia del cáncer. En el melanoma, los linfocitos T CD4 reactivos al tumor también se han asociado con un buen resultado clínico (Robbins PF *et al.*, 2002), y, más recientemente, el mismo grupo demostró 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 de TIL que contienen linfocitos T CD4 específicos podría potenciar la eficacia del tratamiento celular adoptivo (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).

45 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 derivado 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) en cáncer colorrectal, utilizando SLP derivados de P53 (Speetjens FM *et al.*, 2009), en neoplasia intraepitelial vulvar (Kenter GG *et al.*, 2009) y pacientes con cáncer cervicouterino (Welters MJ *et al.*, 2008) utilizando SLP derivados de HPV16. En el caso de la neoplasia vulvar, las respuestas clínicas parecían estar correlacionadas con la inducción de fuertes respuestas inmunitarias específicas de HPV16. Los péptidos largos sintéticos que contienen epítopos tumorales inmunógenos 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 inmunógenos derivados de antígenos asociados a tumores relevantes. Los antígenos diana deben expresarse ampliamente y deben poder inducir respuestas de linfocitos T CD8 y CD4 antineoplásicas consistentes. En el melanoma, el antígeno Melan-A cumple con estos requisitos y los autores de la invención 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 autores de la invención presentaron previamente que la infusión de linfocitos de infiltración tumoral (TIL) específicos para el antígeno MELOE-1 estaba asociada con una supervivencia prolongada sin recidiva para pacientes con melanoma HLA-A2 que recibieron tratamiento con 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 epítopos de clase II en la proximidad del epítipo 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 inmunógeno 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 autores de la invención encuentran nuevos epítomos ubicados todos a lo largo de la secuencia MELOE-1 y caracterizados por su perfil auxiliar T de la respuesta de linfocitos T CD4.

15 Por tanto, la invención se refiere a un péptido antigénico de melanoma que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 o una variante con función conservada de las mismas. 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 de melanoma en pacientes.

**Descripción detallada de la invención**

20 **Definiciones:**

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

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

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

Tabla A: péptidos antigénicos de melanoma de la invención

Número de identificación secuencia	de de	Secuencias	Nomenclaturas utilizadas en la solicitud de patente
Péptido SEQ ID NO: 1		SCVGYPDEATSREQFLPSEC	MELOE-12-21 o 2-21
Péptido SEQ ID NO: 2		VGYPDEATSREQFLPS	MELOE-14-19 o 4-19
Péptido SEQ ID NO: 3		VGYPDEATSREQFL	MELOE-14-17 o 4-17
Péptido SEQ ID NO: 4		GYPDEATSREQFLPS	MELOE-15-19 o 5-19
Péptido SEQ ID NO: 5		PDEATSREQFLPS	MELOE-17-19 o 7-19
Péptido SEQ ID NO: 6		PWHPSERISSTLNDECWPASL	MELOE-126-46 o 26-46
Péptido SEQ ID NO: 7		RISSTLNDECWPAS	MELOE-132-45 o 32-45
Péptido SEQ ID NO: 8		RISSTLNDECWPA	MELOE-132-44 o 32-44
Péptido SEQ ID NO: 9		ERISSTLNDECWPA	MELOE-131-44 o 31-44
Péptido SEQ ID NO: 10		TSREQFLPSEGAACPPWHP	MELOE-111-30 u 11-30
Péptido SEQ ID NO: 11		REQFLPSEGAACPPW	MELOE-113-27 o 13-27
Péptido SEQ ID NO: 12		EQFLPSEGAACPPW	MELOE-114-27 o 14-27
Péptido SEQ ID NO: 13		QFLPSEGAACPPW	MELOE-115-27 o 15-27
Péptido SEQ ID NO: 14		TSREQFLPSEGAA	MELOE-111-23 u 11-23
Péptido SEQ ID NO: 15		SREQFLPSEGAAC	MELOE-112-24 o 12-24
Péptido SEQ ID NO: 16		PSEGAACPPWHPSERISSTL	MELOE-118-37 o 18-37
Péptido SEQ ID NO: 17		AACPPWHPSERISSTLNDECWPASL	MELOE-122-46 o 22-46
Péptido SEQ ID NO: 18		CPPWHPSERISSTL	MELOE-124-37 o 24-37
Péptido SEQ ID NO: 19		CPPWHPSERISST	MELOE-124-36 o 24-36
Péptido SEQ ID NO: 20		MSCVGYPDEATSREQFLPSEGAACPPWHPSERISSTLNDECWPASL	MELOE-11-46 o 1-46
Péptido SEQ ID NO: 21		GHGHSYTTAEELAGIGILTVILGVL	Melan-A16-40L

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que puede unirse específicamente a un antígeno, típica y preferiblemente por unión a un epítomo 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. 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.

5 "Variantes de función conservada", como se usa este documento, se refiere a aquellas en que un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima se ha cambiado (insertado, eliminado o sustituido) sin alterar la conformación global y la función del polipéptido. Dichas variantes incluyen proteínas que tienen alteraciones de los 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 remplazo de uno o más aminoácidos por otro resto de aminoácido en la proteína. Típicamente, un aminoácido dado se reemplaza por un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión por 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, de un 70 % a un 99 % determinada de acuerdo con un esquema de alineación tal como por el Método de Agrupación, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante de función conservada" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60 % de identidad de aminoácidos determina por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 % e incluso más preferiblemente al menos un 95 %, y que tiene las mismas propiedades o funciones o sustancialmente similares que la proteína natural o precursora con la que se compara. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más de un 80 %, preferiblemente más de un 85 %, preferiblemente más de un 90 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente un 90 %, preferiblemente más de un 95 %, son similares (funcionalmente idénticos) sobre la longitud completa de la secuencia más corta. Preferiblemente, 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 cualquier algoritmo de comparación de secuencias como BLAST, FASTA, etc.

La expresión "Complejo principal de histocompatibilidad" (MHC) es una denominación genérica destinada a abarcar los sistemas de antígenos de histocompatibilidad descritos en diferentes especies, incluyendo los antígenos leucocitarios humanos (HLA).

El término "melanoma" como se usa en este documento incluye, aunque sin limitación, todos los tipos de cánceres de melanocitos en todos los estadios de progresión, como cáncer melanocítico metastásico.

35 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.

40 Como se usa en este documento, el término "paciente" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente un paciente de acuerdo con la invención es un ser humano.

45 Una "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, está destinada a una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para conferir beneficio terapéutico 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.

50 El término "adyuvante", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto o una mezcla que puede no ser inmunógena cuando se administra al hospedador en solitario, pero que aumenta la respuesta inmunitaria del hospedador contra un antígeno cuando se administra conjuntamente con ese antígeno.

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

55 Los péptidos antigénicos de melanoma de la invención se definen por 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.

60 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 que puede unirse a la molécula HLA y causar una respuesta celular o humoral en un paciente.

65 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.

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.

5 En una realización de la invención, dichos péptidos antigénicos de melanoma como se describe aquí anteriormente están restringidos a HLA-DQβ 1\*0201.

En una realización de la invención, dichos péptidos antigénicos de melanoma como se describe aquí anteriormente están restringidos a HLA-DQβ 1\*0202.

10 La presente solicitud describe un péptido antigénico, que:

- Es una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 como se define aquí anteriormente.
- 15 - Es una secuencia de aminoácidos de menos de 45 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 como se define aquí anteriormente.
- Es una secuencia de aminoácidos de menos de 40 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 como se define aquí anteriormente.
- Es una secuencia de aminoácidos de menos de 30 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 como se define aquí anteriormente.
- 20 - Es una secuencia de aminoácidos de menos de 25 aminoácidos de longitud que comprende el motivo de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 como se define aquí anteriormente.

25 Como se describe, el péptido antigénico de acuerdo con la invención comprende al menos un 60 % de identidad sobre dicha SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, incluso más preferiblemente al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % y aún puede unirse a la molécula HLA y causar una respuesta celular o humoral en un paciente.

30 Como también se describe, el péptido antigénico de acuerdo con la invención consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 o una variante de las mismas que comprende al menos un 60 %, preferiblemente al menos un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y aún puede unirse a la molécula HLA y causar una respuesta celular o humoral en un paciente.

35 La solicitud también describe péptidos que son variantes de función conservada de péptidos antigénicos que comprenden la SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4 o 5 como se describe aquí anteriormente.

40 Típicamente, la solicitud describe péptidos sustancialmente idénticos a péptidos antigénicos que comprenden la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 en que uno o más restos se han sustituido de forma conservativa con un resto funcionalmente similar y que presenta los aspectos funcionales de los péptidos antigénicos que comprenden la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 como se describe aquí anteriormente, es decir, que aún pueden unirse a una molécula HLA sustancialmente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos dada.

45 Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto apolar (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.

50 La expresión "sustitución conservativa" también incluye el uso de un resto derivatizado químicamente en el 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 que grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos p-tolueno-sulfonilo, grupos carbobenzoilo, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidracidas. 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 aminoácido de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: 4-hidroxi prolina puede sustituir la prolina; 5-hidroxisilina puede sustituir la lisina; 3-metilhistidina puede sustituir la histidina; homoserina puede sustituir la serina; y ornitina puede sustituir la lisina.

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

65 En otra realización, los péptidos antigénicos de la invención pueden incorporarse en polítopos o proteínas de fusión. Dos o más péptidos de la invención pueden unirse conjuntamente de forma directa, o mediante el uso de secuencias flanqueantes. Thompson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (13): 5845-5849 (1995), muestra la unión directa de las

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.*, muestra en particular que politopos o proteínas de fusión, cuando se usan en un modelo de ratón, son útiles para generar tanto inmunidad protectora como anticuerpos.

Por 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)

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 del grupo que consiste en péptidos que tienen la secuencia SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 37 como se describe a continuación.

Péptido SEQ ID NO: 23	X <sub>2</sub> = L	X <sub>9</sub> = A	TLNDECWPA
Péptido SEQ ID NO: 24	X <sub>2</sub> = M	X <sub>9</sub> = A	TMNDECWPA
Péptido SEQ ID NO: 25	X <sub>2</sub> = V	X <sub>9</sub> = A	TVNDECWPA
Péptido SEQ ID NO: 26	X <sub>2</sub> = I	X <sub>9</sub> = A	TINDECWPA
Péptido SEQ ID NO: 27	X <sub>2</sub> = Q	X <sub>9</sub> = A	TQNDECWPA
Péptido SEQ ID NO: 28	X <sub>2</sub> = L	X <sub>9</sub> = V	TLNDECWPV
Péptido SEQ ID NO: 29	X <sub>2</sub> = M	X <sub>9</sub> = V	TMNDECWPV
Péptido SEQ ID NO: 30	X <sub>2</sub> = V	X <sub>9</sub> = V	TVNDECWPV
Péptido SEQ ID NO: 31	X <sub>2</sub> = I	X <sub>9</sub> = V	TINDECWPV
Péptido SEQ ID NO: 32	X <sub>2</sub> = Q	X <sub>9</sub> = V	TQNDECWPV
Péptido SEQ ID NO: 33	X <sub>2</sub> = L	X <sub>9</sub> = L	TLNDECWPL
Péptido SEQ ID NO: 34	X <sub>2</sub> = M	X <sub>9</sub> = L	TMNDECWPL
Péptido SEQ ID NO: 35	X <sub>2</sub> = V	X <sub>9</sub> = L	TVNDECWPL
Péptido SEQ ID NO: 36	X <sub>2</sub> = I	X <sub>9</sub> = L	TINDECWPL
Péptido SEQ ID NO: 37	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 puede usarse en la prevención o el tratamiento de melanoma en pacientes.

En una realización, dicho paciente está genotipado con alelos HLA-DQB1\*0201 o HLA-DQB1\*0202.

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

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.

Como se describe en este 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: 1 a SEQ ID NO: 5. En una realización de la invención, dicho vector de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico correspondiente a un antígeno de melanoma como se define por las reivindicaciones.

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 de forma funcional a la secuencia de ácido nucleico. Los elementos de control de la expresión se insertan en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Ejemplos de elementos de control de la expresión incluyen, aunque sin limitación, el sistema lac, las regiones operadoras y promotoras del fago lambda, promotores de levadura y promotores derivados de poliomavirus, adenovirus, retrovirus, lentivirus o SV40. Elementos funcionales preferidos o requeridos adicionales incluyen, aunque sin limitación, 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 la expresión requeridos o preferidos 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. Ejemplos de dichos elementos

incluyen, aunque sin limitación, orígenes de replicación y marcadores de selección. Además, un experto en la materia entenderá que dichos vectores se construyen fácilmente usando métodos convencionales o disponibles comercialmente.

5 Otro objeto de la invención es una célula hospedadora que comprende un vector de expresión como se describe aquí anteriormente.

10 De acuerdo con la invención, ejemplos de células hospedadoras que pueden usarse son células eucariotas, tales como células de animales, vegetales, de insecto y levadura y células procariotas, tales como *E. coli*. El medio por el que el vector que porta el gen puede introducirse en las células incluye, aunque sin limitación, microinyección, electroporación, transducción o transfección usando DEAE-dextrano, lipofección, fosfato de calcio u otros procedimientos conocidos por un experto en la materia.

15 En una realización preferida, se usan vectores de expresión eucariotas que funcionan en células eucariotas. Ejemplos de dichos vectores incluyen, aunque sin limitación, vectores víricos tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus de la variolovacuna, poxvirus, poliovirus; lentivirus, vectores de expresión bacterianos, plásmidos, tales como pcDNA3 o los vectores de transferencia de baculovirus. Las líneas celulares eucariotas preferidas incluyen, aunque sin limitación, células COS, células CHO, células HeLa, células NIH/3T3, células 293 (ATCC n.º CRL1573), células T2, células dendríticas o monocitos.

20 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 de melanoma en pacientes.

#### 25 **Anticuerpos y usos de los mismos**

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.

30 Como se describe en este documento, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une a péptido antigénico de melanoma que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5. En una realización de la invención, dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une a péptido antigénico de melanoma como se define por las reivindicaciones.

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

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

#### 40 **Multímero de MHC/péptido**

45 Otro objeto de la invención se refiere a un multímero de MHC/péptido que comprende un péptido antigénico de melanoma como se describe aquí anteriormente. De acuerdo con la invención, dicho multímero de MHC/péptido incluye, aunque sin limitación, un dímero, trímero, tetrámero o pentámero de MHC/péptido.

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

50 En otra realización de la invención, dicho multímero de MHC/péptido es un multímero de HLA-DQβ1\*0201 II/péptido antigénico de melanoma o un multímero HLA-DQβ1\*0202/péptido antigénico de melanoma.

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

55 En una realización de la invención, dicho multímero de MHC/péptido puede usarse para visualizar poblaciones de linfocitos T que son específicas para el complejo de HLA-DQβ 1\*0201/péptido antigénico de melanoma o multímero de HLA-DQβ1\*0202/péptido antigénico de melanoma como se describe aquí anteriormente.

60 En otra realización de la invención, dicho multímero de MHC/péptido puede usarse para la detección y/o aislamiento por cribado (en citometría de flujo o por cribado inmunomagnético) de una población de linfocitos T que son específicos para un complejo de HLA/péptido antigénico de melanoma como se describe aquí anteriormente.

65 En otra realización de la invención, dicho multímero de HLA-DQβ 1\*0201/péptido antigénico de melanoma o HLA-DQβ1\*0202/péptido antigénico de melanoma puede usarse para la detección y/o aislamiento por cribado (en citometría de flujo o por cribado inmunomagnético) de una población de linfocitos T que son específicos para un complejo de HLA-DQβ1 \*0201/péptido antigénico de melanoma o multímero de HLA-DQβ1\*0202/péptido antigénico de melanoma como se describe aquí anteriormente.

Otro objeto de la invención es microesferas recubiertas con multímeros de MHC/péptido como se describe aquí anteriormente.

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

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

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

Como se describe en este documento, dicha composición inmunizante comprende un péptido antigénico de melanoma que tiene una secuencia SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5. En una realización, dicha composición inmunizante comprende un péptido antigénico de melanoma como se define por las reivindicaciones.

20 La administración profiláctica de la composición inmunizante de la invención debe servir para prevenir o atenuar el melanoma en un mamífero. En una realización preferida, los mamíferos, preferiblemente seres humanos, con alto riesgo de melanoma se tratan profilácticamente con la composición inmunizante de la invención. Los ejemplos de dichos mamíferos incluyen, aunque sin limitación, seres humanos con antecedentes familiares de melanoma.

25 Cuando se proporciona terapéuticamente, la composición inmunizante de la invención se proporciona para potenciar la propia respuesta inmunitaria del paciente contra el antígeno de melanoma presente en el melanoma o melanoma metastásico.

30 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.

35 En dicha realización, dicha composición inmunizante, para uso humano, comprende al menos un péptido antigénico como se describe aquí anteriormente o al menos un anticuerpo como se describe aquí anteriormente, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. El uno o más vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para el destinatario de los mismos. Las composiciones inmunizantes pueden presentarse, convenientemente, en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método bien conocido en la

40 técnica farmacéutica.

Las composiciones inmunizantes adecuadas para administración intravenosa, intradérmica, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal comprenden, convenientemente, soluciones acuosas estériles del agente activo con soluciones que son preferiblemente isotónicas con la sangre del destinatario. Dichas composiciones pueden

45 prepararse convenientemente, disolviendo el ingrediente 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 las condiciones fisiológicas para producir una solución acuosa y hacer que dicha solución sea estéril. Estas pueden estar presentes en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas precintadas o viales.

50

Las composiciones inmunizantes de la invención pueden incorporar un estabilizante. Estabilizantes ilustrativos son polietilenglicol, proteínas, sacáridos, aminoácidos, ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos que pueden usarse por sí mismos o como mezclas. Estos estabilizantes se incorporan preferiblemente en una cantidad de 0,11-10 000 partes en peso por parte en peso de ingrediente activo. Si tienen que usarse dos o más estabilizantes, sus cantidades totales

55 están preferiblemente dentro del intervalo especificado anteriormente. Estos estabilizantes 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, preferiblemente, 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, preferiblemente, dentro del intervalo de 6-8.

60 Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción. Pueden conseguirse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímero para formar complejo o absorber los péptidos de la invención. El suministro controlado puede ejercerse seleccionando macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliéster, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, acetato de etilvinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina) y la concentración de las macromoléculas, así como los métodos de incorporación para controlar la liberación. Otro posible método para controlar la duración de la acción mediante preparaciones de liberación controlada

65 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 acetato de etilenvinilo. Como alternativa, en lugar de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en sistemas de suministro de fármacos coloidales, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones.

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

La inmunización de un paciente con la composición inmunizante de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, en presencia de adyuvantes convencionales. Ejemplos de adyuvante convencional incluyen, aunque sin limitación, sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptores de tipo toll, saponinas, lípido A, fosfato de alquil glucosaminido, adyuvante de Freund, hemocianina de lapa californiana (KLH), manano, BCG, alumbre, citocinas, tales como IL-1, IL-2, factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral; y otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores, tales como muramil péptidos o componentes de la pared celular bacteriana, toxinas, toxoides y ligandos de TLR.

La composición inmunizante puede administrarse por cualquier vía apropiada para la producción de anticuerpos y/o la activación de linfocitos T, tal como intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea y similares. La composición inmunizante puede administrarse una vez o a intervalos periódicos hasta que se produzca un título significativo de células inmunitarias antinectina 4 o anticuerpo antinectina 4. La presencia de células inmunitarias antinectina 4 puede evaluarse midiendo de la frecuencia de CTL (linfocitos T citotóxicos) precursores contra los péptidos antigénicos de la invención antes y después de la inmunización por marcaje de tetrámero específico o por un ensayo de análisis de precursor de CTL. El anticuerpo puede detectarse en el suero usando un inmunoensayo.

Los anticuerpos dirigidos a los antígenos de la invención también pueden usarse directamente como agentes antimelanoma. Para preparar anticuerpos, un animal hospedador puede inmunizarse usando péptido antigénico de melanoma como se describe aquí anteriormente. El suero o plasma del hospedador se recoge después de un tiempo apropiado para proporcionar una composición que comprende anticuerpos reactivos contra dichos péptidos antigénicos. La fracción de gammaglobulina o los anticuerpos IgG pueden obtenerse, 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 estar asociados con otros agentes antineoplásicos, tales como la quimioterapia.

La composición inmunizante de la invención que comprende anticuerpos como se describe aquí anteriormente, puede hacerse incluso más compatible con el sistema del hospedador minimizando las potenciales respuestas adversas del sistema inmunitario. Esto se consigue eliminando todo o una parte de la parte Fc de un anticuerpo exógeno de la especie o usando un anticuerpo de la misma especie que el paciente hospedador, por ejemplo, el uso de anticuerpos de hibridomas humanos/humanos. Pueden producirse anticuerpos humanizados (es decir, no inmunógenos en un ser humano), por ejemplo, reemplazando una parte inmunógena de un anticuerpo con una parte correspondiente, pero no inmunógena (es decir, anticuerpos quiméricos). Dichos anticuerpos quiméricos pueden contener la parte reactiva o de unión a antígeno de un anticuerpo de una especie y la parte Fc de un anticuerpo (no inmunógeno) de una especie diferente. Ejemplos de anticuerpos quiméricos, incluyen, aunque sin limitación, quimeras de mamífero no humano-humanas, quimeras de roedor-humanas, quimeras murinas-humanas y de rata-humanas.

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

La composición inmunizante que comprende los anticuerpos de la invención también puede usarse como un medio de potenciación de la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos pueden administrarse en cantidades similares a las usadas para otras administraciones terapéuticas de anticuerpo. Por ejemplo, se administra gammaglobulina combinada en un intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg por paciente. Por tanto, los anticuerpos reactivos con los péptidos antigénicos de la invención pueden administrarse de forma pasiva en solitario o junto con otros tratamientos antineoplásicos a un mamífero afectado con cáncer. Ejemplos de tratamientos antineoplásicos incluyen, aunque sin limitación, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia adoptiva con TIL.

Los anticuerpos o anticuerpos quiméricos descritos en este documento también pueden acoplarse a moléculas de toxina, radioisótopos y fármacos por métodos convencionales. Ejemplos de toxinas a las que pueden acoplarse los anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, ricina o toxina diftérica. Ejemplos de fármacos o agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque sin limitación, ciclofosfamida o doxorubicina. Ejemplos de radioisótopos, incluyen, aunque sin limitación, <sup>131</sup>I. Pueden usarse anticuerpos conjugados covalentemente a los agentes mencionados anteriormente en inmunoterapia del cáncer para tratar melanoma.

Si el paciente a inmunizar ya está afectado con cáncer o cáncer metastásico, la composición inmunizante de la

invención puede administrarse junto con otros tratamientos terapéuticos. Ejemplos de otros tratamientos terapéuticos incluyen, aunque sin limitación, inmunoterapia adoptiva de linfocitos T, coadministración de citocinas u otros fármacos terapéuticos para el cáncer.

5 La dosis de péptido antigénico de la invención a administrar a un paciente puede ajustarse según lo apropiado dependiendo de, por ejemplo, la enfermedad 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, son dosis preferidas de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg por paciente.

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

15 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.

20 En otra realización, dicho paciente está genotipado con alelos HLA-DQβ1\*0201 o HLA-DQβ1\*0202.

#### **Célula presentadora de antígeno**

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

En una realización de la invención, dicho antígeno del complejo HLA es un antígeno HLA-DQβ1\*0201 o HLA-DQβ1\*0202.

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

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

40 Para preparar dichas APC de la invención, se aíslan células que tienen una capacidad presentadora de antígeno 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-DQβ1\*0201 o HLA-DQβ1\*0202.

45 En caso de que se usen células dendríticas, la APC de la invención puede prepararse de la siguiente manera. Se aíslan linfocitos de sangre periférica del paciente a tratar por el método Ficoll; las células adherentes se separan de las células no adherentes; las células adherentes se cultivan entonces en presencia de GM-CSF e IL-4 para inducir células dendríticas; y las células dendríticas se pulsan por 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 entonces pueden volver a administrarse al paciente a tratar. Dichos métodos se describen en los documentos WO93/208185 y EP0563485.

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

55 En una realización de la invención, dichas células presentadoras de antígeno comprenden un antígeno complejo HLA-DQβ1\*0201 o HLA-DQβ1\*0202 y un péptido antigénico de melanoma de la invención.

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

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

65 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 a HLA-DQβ1\*0201 o HLA-DQβ1\*0202.

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

En otra realización, dicho linfocito T es un linfocito T modificado genéticamente 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 tratamiento adoptivo, que comprende dichos linfocitos T como se describe aquí anteriormente que reconocen 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 de melanoma, se ha observado que una inmunoterapia adoptiva, en la que se cultiva *ex vivo* infiltrado de linfocitos T intratumorales recogidos del paciente a tratar en grandes cantidades, y después se devuelve al paciente, consigue una mejora 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 puede conseguirse, por ejemplo, por vía intravenosa o intratumoral. Devolviendo los linfocitos T que reconocen específicamente el péptido antigénico de la invención al cuerpo del paciente, se potencia la toxicidad de dichos linfocitos T, o la estimulación de linfocitos T citotóxicos CD8 por dichas células hacia células tumorales en el paciente que es positivo para el péptido antigénico de melanoma de la invención. Las células tumorales se destruyen y de ese modo se consigue el tratamiento del tumor.

25 Ejemplos de linfocitos T que pueden aislarse, incluyen, aunque sin limitación, linfocitos de células de sangre periféricas (PBL), ganglios linfáticos o linfocitos de infiltración tumoral (TIL).

30 Dichos linfocitos pueden aislarse de sangre tumoral o periférica del individuo a tratar por métodos conocidos en la técnica y pueden cultivarse *in vitro*. Los linfocitos se cultivan en medio tal como RPMI o RPMI 1640 durante 2-5 semanas, preferiblemente durante 2-3 semanas. La viabilidad se evalúa por ensayo de exclusión de tinte azul tripano. Los linfocitos se exponen al péptido antigénico de la invención 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 (µg)/ml toda la duración del cultivo de linfocitos. Pueden añadirse citocinas al cultivo de linfocitos, tal como IL-2.

El péptido antigénico de melanoma de la invención puede añadirse al cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas o células de líneas celulares cancerosas irradiadas alogénicas.

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

45 Ejemplos de la manera en que pueden administrarse estos linfocitos T sensibilizados al mamífero incluyen, aunque sin limitación, por vía intravenosa, intraperitoneal o intralesional. Los parámetros que pueden evaluarse para determinar la eficacia de estos linfocitos T sensibilizados incluyen, aunque sin limitación, la producción de células inmunitarias en el paciente que se está tratando o la regresión tumoral. Se usan métodos convencionales para evaluar estos parámetros. Dicho tratamiento puede darse 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:

- (a) estimular células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o linfocitos de infiltración tumoral (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 uno o más péptidos antigénicos de melanoma usados en (a),
- (c) opcionalmente, clonar dicha población de linfocitos T específicos para el uno o más péptidos antigénicos de melanoma usados en (a).

60 El enriquecimiento y/o la clonación se pueden realizar usando un multímero de MHC/péptido como se describe aquí anteriormente. La clonación también puede realizarse por 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-DQβ1\*0201 o HLA-DQβ 1\*0202. En dicha realización, el enriquecimiento y/o clonación pueden realizarse usando un multímero de HLA-DQβ1\*0201 o HLA-DQβ1\*0202/péptido como se describe

aquí anteriormente.

La estimulación de PBMC puede realizarse con al menos un péptido antigénico de melanoma de la invención en solitario, o presentado por una célula presentadora de antígeno tal como células dendríticas o células de líneas celulares cancerosas irradiadas alogénicas. Típicamente, también pueden añadirse citocinas tales como la IL-2 al cultivo.

Otro objeto de la invención es una composición para tratamiento adoptivo 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 necesita, en la que dichos linfocitos T tiene que volver a administrarse al paciente.

En una realización, dichos linfocitos que reconocen específicamente el péptido antigénico de la invención están restringidos a HLA-DQ $\beta$ 1\*0201 o HLA-DQ $\beta$ 1\*0202.

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 aquí anteriormente o

(b) al menos una proteína de fusión como se describe aquí anteriormente, o

(c) al menos una secuencia de ácido nucleico como se describe aquí anteriormente, o

(d) al menos un vector de expresión como se describe aquí anteriormente, o

(e) al menos una célula hospedadora como se describe aquí anteriormente, o

(f) al menos un anticuerpo como se describe aquí anteriormente.

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 reconocen específicamente el péptido antigénico de melanoma de la invención. En una realización, dichos linfocitos T están restringidos a HLA-DQ $\beta$ 1\*0201 o HLA-DQ $\beta$ 1\*0202.

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 del complejo HLA y un péptido antigénico de melanoma de la invención. En una realización, dicho complejo de HLA/péptido es un complejo de HLA-DQ $\beta$ 1\*0201 o HLA-DQ $\beta$ 1\*0202/péptido antigénico de la invención.

La invención se ilustrará adicionalmente por 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.

#### Figuras:

**Figura 1:** (A) Porcentajes de linfocitos T CD4 productores de TNF- $\alpha$  entre microcultivos positivos. Catorce días después de la estimulación de PBMC con polipéptido completo MELOE-1 (2-46), los microcultivos se volvieron a estimular con cada péptido indicado durante 5 horas. Entonces se evaluó la producción de TNF- $\alpha$  por doble marcaje de TNF- $\alpha$  y CD4. Los resultados se analizaron con un ensayo no paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido de un ensayo *a posteriori* de Dunns. (B) Frecuencia de microcultivos que contienen linfocitos T CD4 específicos para péptidos MELOE-1 (evaluados por tinción intracelular de TNF- $\alpha$  después de la reestimulación con los 4 péptidos indicados). Se analizaron 624 microcultivos (de 7 donadores sanos) mediante una tabla de contingencia seguida de un ensayo exacto 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 polipéptido completo MELOE-1 (2-46), los microcultivos se volvieron a estimular con cada péptido indicado durante 5 horas. Después se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  (panel izquierdo) e IL4 (panel derecho) mediante triple marcaje de IFN- $\gamma$ , IL4, CD4. Los resultados se analizaron con un ensayo no paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido de un ensayo *a posteriori* de Dunns. (B) Frecuencia de microcultivos que contienen linfocitos T CD4 específicos para péptidos MELOE-1 (evaluados por tinción intracelular de IFN- $\gamma$  o IL4 después de reestimulación con los 3 péptidos indicados). Se analizaron 576 microcultivos (de 10 pacientes con melanoma) mediante una tabla de contingencia seguida de un ensayo exacto de Fisher.

**Figura 3:** Elemento de restricción a HLA de clones de linfocitos T específicos de MELOE-1 y reactividad contra líneas celulares de melanoma de HLA coincidente. La restricción a HLA de los clones de linfocitos T específicos de MELOE-1 se evaluó en primer lugar usando anticuerpos de bloqueo anti-HLA (panel superior). Los clones de linfocitos T se estimularon durante 5 horas en presencia de brefeldina A (10  $\mu$ g/ml) con péptido en solitario (10  $\mu$ M) en un ensayo de autopresentación y en presencia o no de anticuerpos bloqueantes a una concentración de 12,5  $\mu$ g/ml. La restricción a HLA se confirmó con líneas celulares B-EBV de HLA coincidente pulsadas 2 horas con el péptido afín, a una relación 1:2 (panel central). Se evaluó la reactividad de cada clon de linfocitos T contra células de melanoma que expresan HLA de clase II, en presencia o no de péptido exógeno (panel inferior). Después de 5 horas de estimulación, las células entonces se tiñeron con mAb anti-CD4 conjugado con APC, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se marcaron con mAb anti-TNF- $\alpha$  conjugado con PE y se analizaron por citometría de flujo.

**Figura 4:** Los epítomos de clase II se procesan de forma natural a partir de antígeno completo MELOE-1. DC autólogas, se cargaron (antes o después de la fijación) con MELOE-1<sub>2-46</sub> (1 µM) o, como control negativo, con el péptido Melan-A<sub>16-40L</sub> (1 µM) y se maduraron. Después se estimularon clones de linfocitos T con CD a una relación de 1:1, durante 5 h en presencia de brefeldina A, después se tiñeron con mAb anti-CD3 conjugado con APC, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se marcaron con mAb anti-TNF-a conjugado con PE y se analizaron por citometría de flujo. Los histogramas ilustraban el % de células productoras de TNF-a entre los linfocitos T CD3 positivos.

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

**Tabla I:** MELOE-1 y secuencias peptídica derivadas de MELOE-1.

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

Todos los péptidos se adquirieron de la empresa Millegen (Francia), con una pureza > 85 %. En negrita se indican los epítomos solapantes 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 a HLA-A2 (TLNDECWPA, SEQ ID NO: 23)).

**Tabla II:** Evaluación de respuestas de linfocitos T CD4 contra MELOE-1 en PBMC de donadores sanos.

Donador	Microcultivos que contienen linfocitos T CD4+ específicos de MELOE-1 (producción de TNF-α)				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 % ± 0,6)	13/96 (2,4 % ± 1,5)	6/96 (1,4 % ± 0,6)	5/96 (1,5 % ± 0,5)	DPβ1*0902/1501 DQB1*0301 DRβ1*1104/1201
<b>HD17</b>	6/96 (3,2 % ± 1,9)	26/96 (8,2 % ± 6,5)	7/96 (3 % ± 0,7)	10/96 (5,2 % ± 4,1)	DPβ1*0401/0301 DQB1*0301/0603 DRβ1*1101/1301
<b>HD22</b>	1/96 (1 %)	2/96 (3,9 % ± 3,3)	0/96	2/96 (1 % ± 0,1)	DPβ1*0401/1101 DQB1*0202 DRβ1*0701
<b>HD24</b>	3/96 (1,3 % ± 0,8)	46/96 (2 % ± 1,4)	0/96	0/96	DPβ1*0401/0101 DQB1*0501/0602 DRβ1*0101/1501
<b>HD25</b>	3/96 (0,6 % ± 0,1)	3/96 (1,2 % ± 0,7)	0/96	15/96 (1,1 % ± 0,9)	DPβ1*0401/0402 DQB1*0201 DRβ1*0301
<b>HD27</b>	0/96	5/96 (5 % ± 3,4)	0/96	0/96	DPβ1 NA DQB1*501/0201 DRβ1*0101/0301
<b>HD28</b>	30/48 (2,7 % ± 1,2)	14/48 (2,4 % ± 0,9)	0/48	0/96	DPβ1 NA DQNA DRβ1*0301

Se estimularon PBMC de donadores sanos con 10 µM de MELOE-1. Después de 14 días, se evaluó la presencia de linfocitos T CD4 específicos para las diferentes regiones de MELOE-1 por reestimulación de las 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 de una doble tinción de CD4/TNF-a y análisis de citometría de flujo. Entre paréntesis se indica la media del % de linfocitos T CD4 productores de TNF-a, en microcultivos positivos. NA: no disponible.

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

	<b>Microcultivos que contienen linfocitos T CD4+ específicos de MELOE-1</b>					
	Respuestas Th1 (microcultivos IFN- $\gamma$ positivos)			Respuestas Th2 (microcultivos IL4 positivos)		
	<b>MELOE-1<sub>2,21</sub></b>	<b>MELOE-1<sub>11,30</sub></b>	<b>MELOE-1<sub>22,46</sub></b>	<b>MELOE-1<sub>2,21</sub></b>	<b>MELOE-1<sub>11,30</sub></b>	<b>MELOE-1<sub>22,46</sub></b>
<b>Pt # 1</b>	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)
<b>Pt # 2</b>	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
<b>Pt # 3</b> DP $\beta$ 1*0201/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
<b>Pt # 4</b>	0/48	9/48 (0,9 % $\pm$ 0,5)	0/48	1/48 (0,7 %)	0/48	0/48
<b>Pt # 5</b>	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 %)
<b>Pt # 6</b>	0/48	5/48 (1,5 % $\pm$ 1,9)	0/48	0/48	0/48	0/48
<b>Pt # 7</b>	0/48	0/48	28/48 (2,9 % $\pm$ 3,5)	0/48	0/48	7/48 (1,5 % $\pm$ 0,7)
<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)

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>, 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 la media del % de linfocitos T CD4 productores de citocinas, 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	VB2.1	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>
		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-DQ $\beta$ 1 *0201)		
Cadena beta V	VB2.1	TNF <sup>alto</sup>
CDR3 beta	CSA SGRRKFYEQ YFG	IFN <sup>alto</sup>
cadena beta J	J $\beta$ 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  $\mu$ g/ml) con el péptido afín (10  $\mu$ M) en un ensayo de autopresentación. Después de 5 horas de estimulación, las células se tiñeron con mAb anti-CD4 conjugado con APC, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se marcaron con mAb 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 bovino fetal (FCS) 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 %) usados en este estudio se describen en la tabla I. Los monómeros HLA-A\*0201/MELOE-1<sub>36-44</sub> se generaron en 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 donadores 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. Entonces, se pulsaron CDi con la proteína MELOE-1 (1 µM) completa o Melan-A<sub>16-40</sub> A27L modificado como control negativo (1 µM) y se dejaron madurar con 20 ng/ml de TNF-α 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 %. Como alternativa, las CDi se dejaron madurar en primer lugar, se fijaron y luego se pulsaron con antígenos a la misma concentración.

Estimulación de linfocitos T específicos de MELOE-1

Se cultivaron PBMC de donadores sanos o pacientes con melanoma ( $2 \cdot 10^5$  células/pocillo) durante 14 días con 10 µM 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. Entonces los microcultivos se volvieron a estimular individualmente con cada péptido solapante (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 µg/ml de brefeldina A durante 5 horas y el porcentaje de linfocitos T específicos CD4+ se evaluó mediante tinción intracelular de TNF-α, IFN-γ o IL-4. Se incluyó un control negativo sin péptido en todos los experimentos.

Como alternativa, 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 describe 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 usó 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 °C en presencia del péptido icosamérico 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 µg/ml) con péptido solo (10 µM) en un ensayo de autopresentación o con células de melanoma que expresan B-EBV o HLA de clase II pulsadas 2 horas con el péptido afín, en una relación 1:2. En algunos experimentos, el mAb de bloqueo contra HLA-DP (clon B7.21 del Dr. Charron, UMR940, París), HLA-DQ (clon SPVL3, Beckman Coulter) o HLA-DR (clon L243, BD Biosciences) se añadió a una concentración de 12,5 µg/ml. Las células se tiñeron luego con mAb anti-CD4 conjugado con APC, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se marcaron con mAb anticitocina conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo.

## Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se hicieron con el programa informático GraphPad Prism®. Se usaron gráficos de barras para comparar las frecuencias de linfocitos T específicos para péptidos derivados de MELOE-1, en todos los donadores y pacientes, y se analizaron mediante una tabla de contingencia seguida de un ensayo exacto de Fisher. Se hicieron gráficos de puntos de dispersión para comparar el porcentaje de células TNFa positivas entre microcultivos positivos y se analizaron con un ensayo no paramétrico (Kruskal-Wallis seguido de un ensayo *a posteriori* de Dunns).

## **Resultados**

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

El propósito fue buscar la existencia de epítomos auxiliares de clase II a lo largo de toda la secuencia MELOE-1 (SEQ ID NO: 20), para documentar la inmunogenia de las diferentes regiones de este antígeno de melanoma. Se estimularon  $2.10^7$  PBMC de siete donadores sanos con el antígeno completo MELOE-1 y se ensayó, después de un periodo 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 TNFa mediante linfocitos T CD4+, después de la reestimulación con cuatro péptidos solapantes derivados de MELOE-1 (tabla I), en un ensayo de autopresentación. Como se muestra en la tabla II, todos los donadores mostraron respuestas de CD4 contra al menos 1 de 4 péptidos solapantes. Se detectaron respuestas contra la región del extremo N de MELOE-1 (2-21) en 6/7 donadores, con frecuencias bastante bajas (de un 1 a un 9 % de los microcultivos positivos que contenían entre un 0,6 y un 5,6 % de los linfocitos T CD4 productores de TNFa), excepto en el donador sano HD28, que mostró un 62 % de microcultivos positivos. La región 11-30 parece especialmente inmunógena, con respuestas específicas de CD4 detectadas en cada donador ensayado (de un 2 a un 48 % de los microcultivos positivos que contenían entre un 0,7 y un 24 % de los linfocitos T CD4 productores de TNFa), y con frecuencias muy altas en tres donadores (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 icosamérico (Rogel *et al.*, 2011), indujo respuestas específicas en microcultivos procedentes de solo 2/7 donadores (HD9 y HD17, que expresan ambos el elemento DR11). En estos dos donadores, se detectó un 6 y un 7 % de microcultivos positivos, que contenían entre un 0,6 y un 3,7 % de linfocitos T CD4 productores de TNFa. Finalmente, la región del extremo C (26-46), que contiene un epítomo restringido por DQ6 ya descrito (Rogel *et al.*, 2011), se reconoció mediante microcultivos estimulados de 4 de 7 donadores (no todos expresaban el elemento DQ6), con frecuencias que varían de un 2 a un 16 % de los microcultivos que contienen entre un 0,5 y un 16 % de los linfocitos T CD4 productores de TNFa. En general, la frecuencia de microcultivos MELOE-1<sub>11-30</sub> positivos fue significativamente mayor que la frecuencia de microcultivos específicos para las otras tres regiones de MELOE-1 (figura 1B) ( $p < 0,0001$ ). Las dos regiones terminales (2-21 y 26-46) eran equivalentes en términos de frecuencias de microcultivos positivos, y estas dos regiones indujeron significativamente más respuestas que la región central 18-37 (figura 1A). No obstante, 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 inmunogenia de cada región de MELOE-1 en pacientes con melanoma, se estimularon PBMC de pacientes con melanoma con la proteína completa MELOE-1 y se ensayó la reactividad de los linfocitos estimulados hacia las tres regiones más inmunógenas: 2-21, 11-30 y 22-46. Para este estudio, en lugar de exponer los microcultivos al péptido 18-37, que parecía poco inmunógeno, se amplió región del extremo C de 26-46 a 22-46, para detectar también respuestas contra el epítomo restringido por HLA-DR11 descrito previamente (24-37). De hecho, la ubicación de este epítomo 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 epítomo MELOE-1<sub>24-36</sub> se indujeron eficazmente mediante la estimulación del péptido 22-46 (Rogel *et al.*, 2011). Se ensayó 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-g), mientras 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 del extremo N de MELOE-1 (2-21) fueron significativamente menos frecuentes que las específicas para la región central ( $p < 0,0001$ ) y la región del extremo C ( $p = 0,0001$ ), con respectivamente un 3,3 %, un 10,8 % y un 9,6 % de 576 microcultivos ensayados (figura 2A). Con respecto a las respuestas Th2, mucho menos frecuentes, la región del extremo C 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 donadores 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 epítomos ubicados a lo largo de la secuencia proteínica, y entre las diferentes regiones, la región central (11-30) y la

región del extremo C (22-46) parecían ser especialmente inmunógenas en términos de frecuencia de respuestas.

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

5 Para caracterizar formalmente los epítomos reconocidos, se obtuvieron clones de linfocitos T CD4 específicos para cada región de MELOE-1 mediante dilución limitante, a partir de microcultivos de donadores 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, en primer lugar, mediante el uso de anticuerpos monoclonales de bloqueo de HLA de clase II (figura 3, panel superior), y luego mediante ensayo del reconocimiento de líneas celulares B-EBV de HLA coincidente cargadas con cada péptido largo reconocido (figura 3, panel central).  
 10 Los dos clones de linfocitos T llamados 9C12 y 4E2, derivados de HD22 y HD25 y específicos para MELOE-1<sub>2-21</sub> y MELOE-1<sub>26-46</sub> estaban restringidos por las moléculas HLA-DQ $\beta$ 1\*0202 y DQ $\beta$ 1\*0201, respectivamente. Como estos dos donadores eran homocigóticos para el locus HLA-DQ, se ensayó una única línea celular B-EBV de HLA-DQ coincidente 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 de HLA coincidente 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 ensayó la reactividad de estos clones de linfocitos T CD4 contra líneas celulares de melanoma de HLA coincidente positivas para la expresión de *meloe*, mediante análisis de qPCR. Todas las líneas celulares de melanoma ensayadas expresaban HLA-DQ y DR en la superficie celular. Todos los clones de linfocitos T eran reactivos contra las líneas celulares de melanoma de HLA coincidente cuando se cargaban 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 DQ $\beta$ 1\*0201 y 0202 cargadas con péptido. En ausencia de péptido, solo el clon de linfocitos T restringido por 4E2 DQ  $\beta$ 1\*0201 pudo reconocer la línea celular de melanoma M77 no cargada (también DQ $\beta$ 1\*0201), pero no la línea celular de melanoma DQ $\beta$ 1\*0202, M88. Asimismo, el clon 5F9 de linfocitos T restringido por DR1 también reconoció una de la línea celular de melanoma DR $\beta$ 1\*0101, en ausencia de péptido exógeno (M101).  
 25

También se documentó el perfil 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 expresaban citocinas Th1 (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , 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 expresaba débilmente IL4 (tabla IV). Ninguna de los linfocitos T CD4 expresa IL10 o IL5 a un nivel significativo.  
 30

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

Se realizó estimulación inicial de PBMC con el antígeno completo MELOE-1 y, por tanto, se supone que se generaron respuestas de los linfocitos T CD4 contra los péptidos procesados de manera natural por los monocitos. No obstante, no se podía excluir formalmente que el periodo de cultivo de 14 días generara artificialmente epítomos de clase II más cortos que provocaran respuestas de linfocitos T CD4. Por tanto, seguía siendo crucial evaluar que todos estos nuevos epítomos fueran 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  $\mu$ M 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 frente a CD cargadas con un péptido largo irrelevante, sintetizado en las mismas condiciones (Melan-A<sub>16-40L</sub>).  
 45

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 tanto, los cuatro nuevos epítomos identificados mediante la estimulación de PBMC, se procesan de manera natural a partir del antígeno MELOE-1.  
 50

60 Caracterización de los epítomos mínimos reconocidos

Los clones de linfocitos T fueron reactivos contra péptidos icosaméricos que probablemente no son los péptidos exactos procesados de manera natural. Para identificar formalmente los epítomos mínimos reconocidos, se ensayaron péptidos más cortos derivados de cada una de las regiones reconocidas de MELOE-1, elegida basándose en la secuencia de péptidos centrales que supuestamente deben reconocerse por los clones de linfocitos T (indicado en negrita en la figura 5).  
 65

Tres péptidos más cortos se reconocieron mejor por el clon de linfocitos T 9C12 restringido por DQ2, siendo el más corto MELOE-1<sub>7-19</sub> (tridecamérico), reconocido con una CE50 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 tetradecamérico (31-44) también con una CE50 de 100 nM, y también reconoció en menor medida el epítipo 32-44 (figura 5) descrito previamente 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 tridecaméricos, MELOE-1<sub>15-27</sub> para el clon 1A5 de linfocitos T restringido por DRβ1 \*1101 (CE50 = 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 tanto, 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:

- 15 A lo largo de la presente solicitud, varias referencias describen el estado de la materia a la 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.
- 20 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.
- 25 Chauvin JM, Larrieu P, Sarrabayrouse 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 Jalpha usage does not result from homologous chromosomal pairing during ValphaJalpha rearrangement. *EMBO J* 2001; 20: 4717-29.
- 30 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.
- 35 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.
- 45 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.
- 55 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.
- 60 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 S A* 1996; 93: 7855-60.
- 65 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.

5

Listado de secuencias

<110> INSERM

10

<120> NUEVO PÉPTIDO ANTIGÉNICO DE MELANOMA Y USOS DEL MISMO

<130> BIO121113 LABARRIERE

<160> 37

15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 20

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25

<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

30

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> péptido

<400> 2

40

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

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

45

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

50

<400> 3

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

55

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 753 392 T3

<223> péptido

<400> 4

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

<210> 5  
<211> 13  
<212> PRT  
10 <213> Artificial

<220>  
<223> péptido

15 <400> 5

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

<210> 6  
20 <211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> péptido

<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

30 <210> 7  
<211> 14  
<212> PRT  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> péptido

<400> 7

40 Arg Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala Ser  
1 5 10

<210> 8  
45 <211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
50 <223> péptido

<400> 8

Arg Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala  
1 5 10

55 <210> 9  
<211> 14



ES 2 753 392 T3

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

5 <210> 14  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> péptido  
 <400> 14

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

15 <210> 15  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> péptido  
 <400> 15

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

30 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <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

40 <210> 17  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> péptido  
 <400> 17

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

50 Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala Ser Leu  
 20 25

ES 2 753 392 T3

<210> 18  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> péptido  
 <400> 18  
 10  
           Cys Pro Pro Trp His Pro Ser Glu Arg Ile Ser Ser Thr Leu  
           1                          5                          10  
  
 <210> 19  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> péptido  
 20  
 <400> 19  
  
           Cys Pro Pro Trp His Pro Ser Glu Arg Ile Ser Ser Thr  
           1                          5                          10  
  
 25  
 <210> 20  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <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  
  
           Ile Ser Ser Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala Ser Leu  
                           35                          40                          45  
 35  
  
 <210> 21  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> péptido  
 45  
 <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  
 50  
 <210> 22  
 <211> 9

ES 2 753 392 T3

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> péptido  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 10 <223> X es L, M, V, I o Q  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 15 <223> X es A, V o L  
  
 <400> 22  
  
 Thr Xaa Asn Asp Glu Cys Trp Pro Xaa  
 20 1 5  
  
 <210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25  
  
 <220>  
 <223> péptido  
  
 <400> 23  
 30  
  
 Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala  
 1 5  
  
 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 35  
  
 <220>  
 <223> péptido  
 40  
  
 <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  
  
 <400> 25  
  
 Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala  
 55 1 5  
  
 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 60 <213> Artificial

ES 2 753 392 T3

<220>  
 <223> péptido  
 <400> 26  
 5                   **Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala**  
                     1                                   5

<210> 27  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 10

<220>  
 <223> péptido  
 <400> 27  
 15                   **Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Ala**  
                     1                                   5

<210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20

<220>  
 <223> péptido  
 <400> 28  
 25                   **Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val**  
                     1                                   5

<210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30

<220>  
 <223> péptido  
 <400> 29  
 35                   **Thr Met Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val**  
                     1                                   5

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

<220>  
 <223> péptido  
 <400> 30  
 45                   **Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val**  
                     1                                   5

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

<220>  
 55

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 60

<220>

ES 2 753 392 T3

<223> péptido  
 <400> 31

5 Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val  
 1 5

<210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido

15 <400> 32

Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Val  
 1 5

<210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> péptido

<400> 33

Thr Leu Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
 1 5

30 <210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 35 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido

<400> 34

40 Thr Met Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
 1 5

<210> 35  
 <211> 9  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido

50 <400> 35

Thr Val Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
 1 5

55 <210> 36  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> péptido

ES 2 753 392 T3

<400> 36

Thr Ile Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
1 5

5

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

10

<220>  
<223> péptido

15

<400> 37

Thr Gln Asn Asp Glu Cys Trp Pro Leu  
1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido antigénico de melanoma de menos de 20 aminoácidos de longitud y que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, para su uso en la prevención o en el tratamiento de melanoma en pacientes.
2. El péptido antigénico de melanoma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido es una secuencia de aminoácidos de menos de 15 aminoácidos de longitud, o en el que dicho péptido antigénico de melanoma consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 5.
- 10 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 aminoácidos: - TX<sub>2</sub>NDECWPX<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 23) en el que 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 el tratamiento de melanoma en pacientes.
- 15 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 el que el paciente está genotipado con alelos HLA-DQβ1\*0201 o HLA-DQβ1\*0202.
- 20 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.
- 25 6. El linfocito T para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho linfocito T tiene volver a administrarse al paciente.
7. Un método para producir linfocitos T como se define en la reivindicación 5, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 30 (a) estimular PBMC, o linfocitos de infiltración tumoral, 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 uno o más péptidos antigénicos de melanoma usados en (a), y
- 35 (c) opcionalmente, clonar dicha población de linfocitos T específicos para el uno o más péptidos antigénicos de melanoma usados en (a).
- 40 8. Un péptido antigénico de melanoma que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, en el que dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 15 aminoácidos de longitud, o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
9. El péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho péptido consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
- 45 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 aminoácidos: - TX<sub>2</sub>NDECWPX<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 23) en el que X<sub>2</sub> es leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y X<sub>9</sub> es alanina, valina o leucina.
- 50 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.
- 55 13. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Un anticuerpo o fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une al péptido antigénico de melanoma de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.
- 60 15. Una composición inmunizante que comprende:
- (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
- 65 (e) al menos una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 13, o
- (f) al menos un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14.

16. Un linfocito T que reconoce específicamente el péptido antigénico de melanoma como se define en la reivindicación 8 o 9, o el péptido antigénico de melanoma como se define en la reivindicación 8 o 9, comprendido en la proteína de fusión como se define en la reivindicación 10.

5

17. Una composición para tratamiento adoptivo que comprende los linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 16.

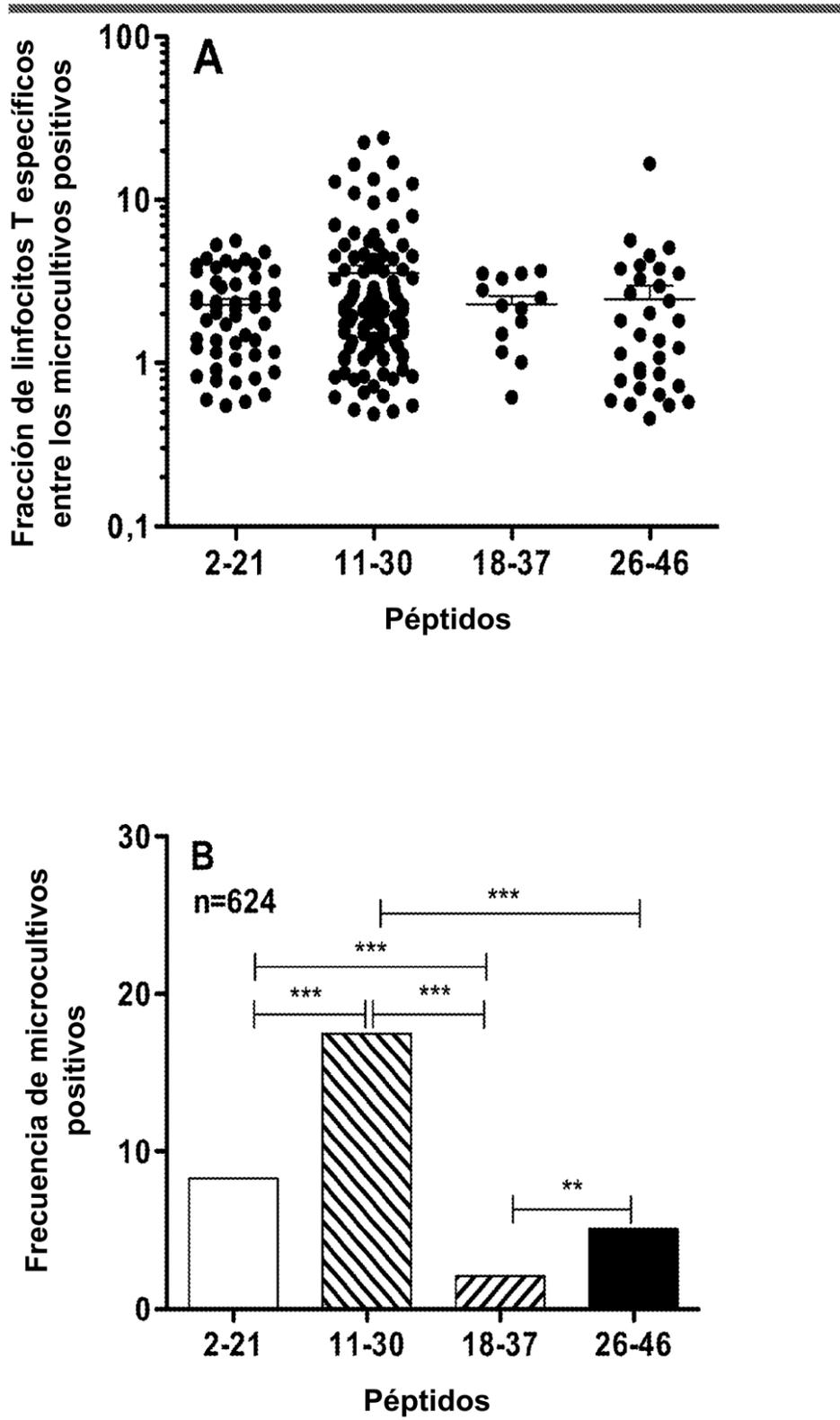


Figura 1

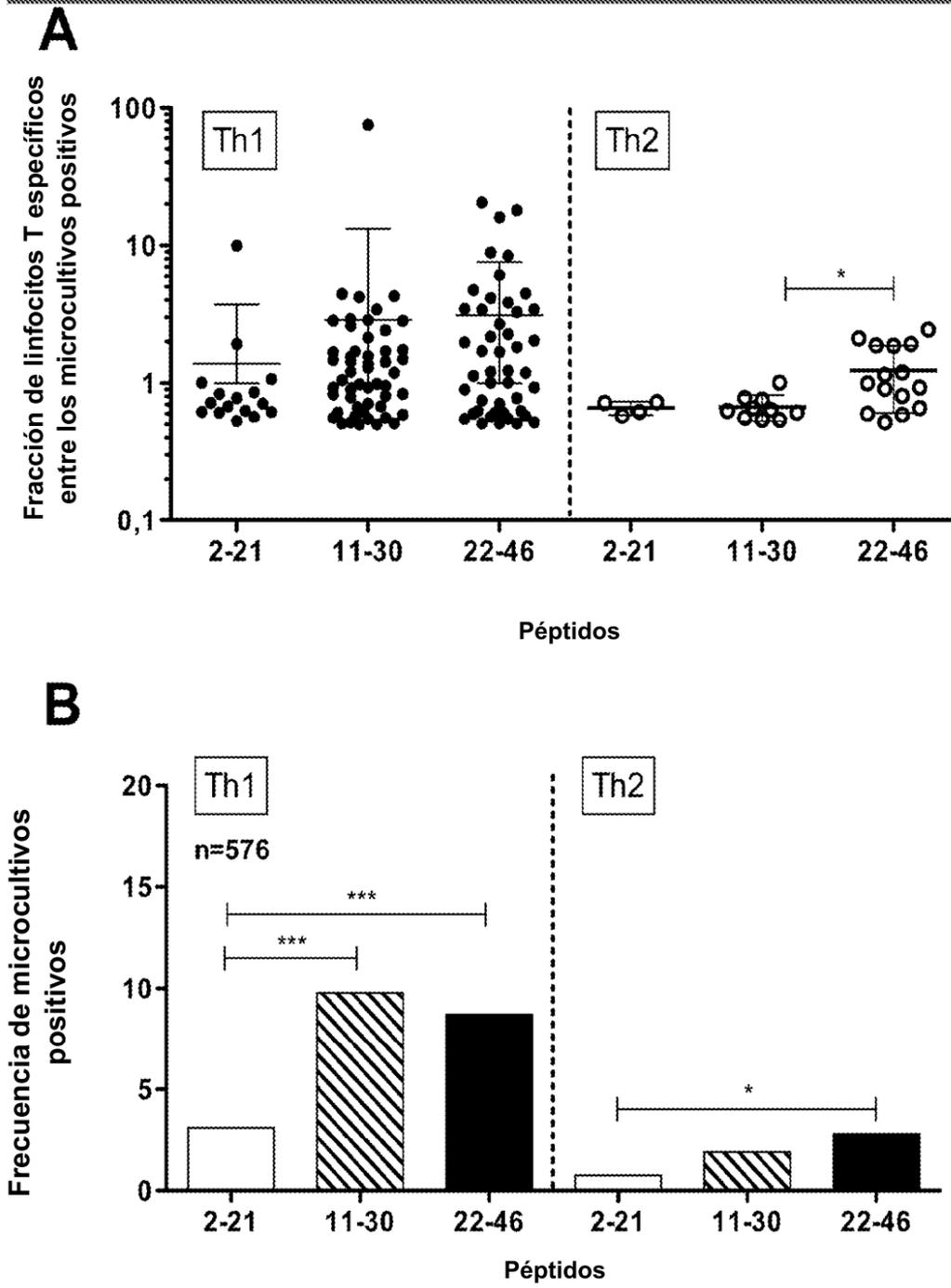


Figura 2

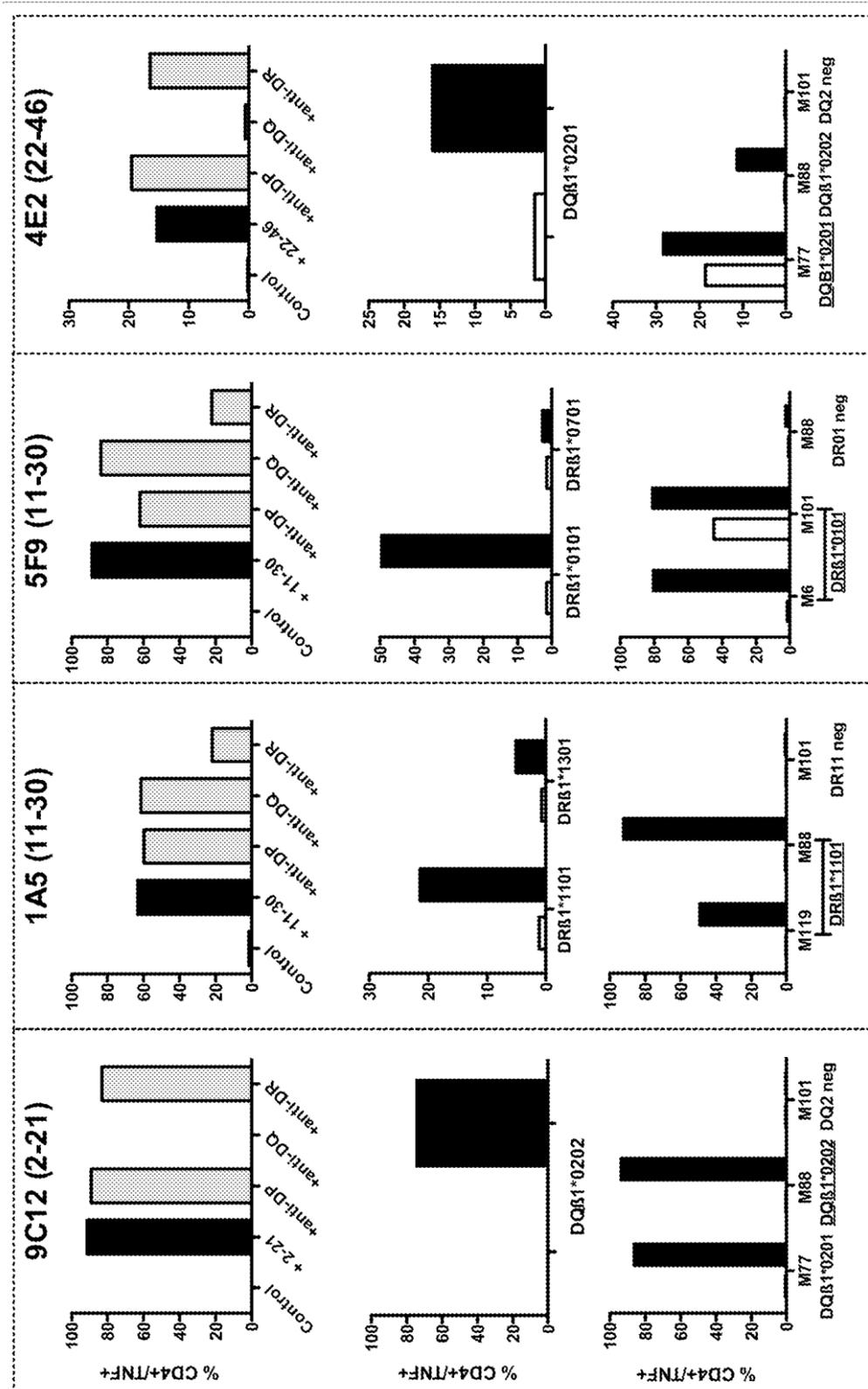


Figura 3

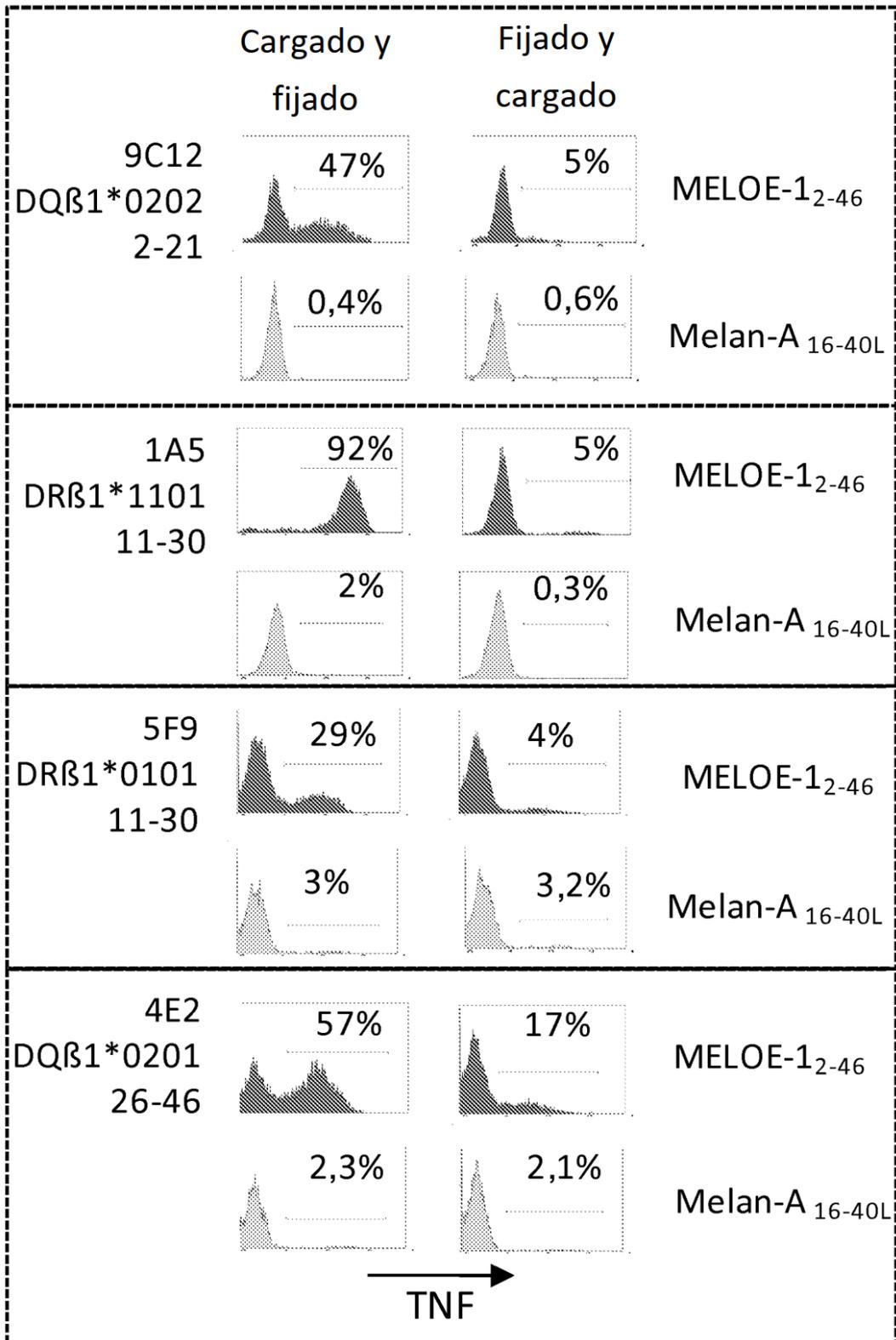


Figura 4

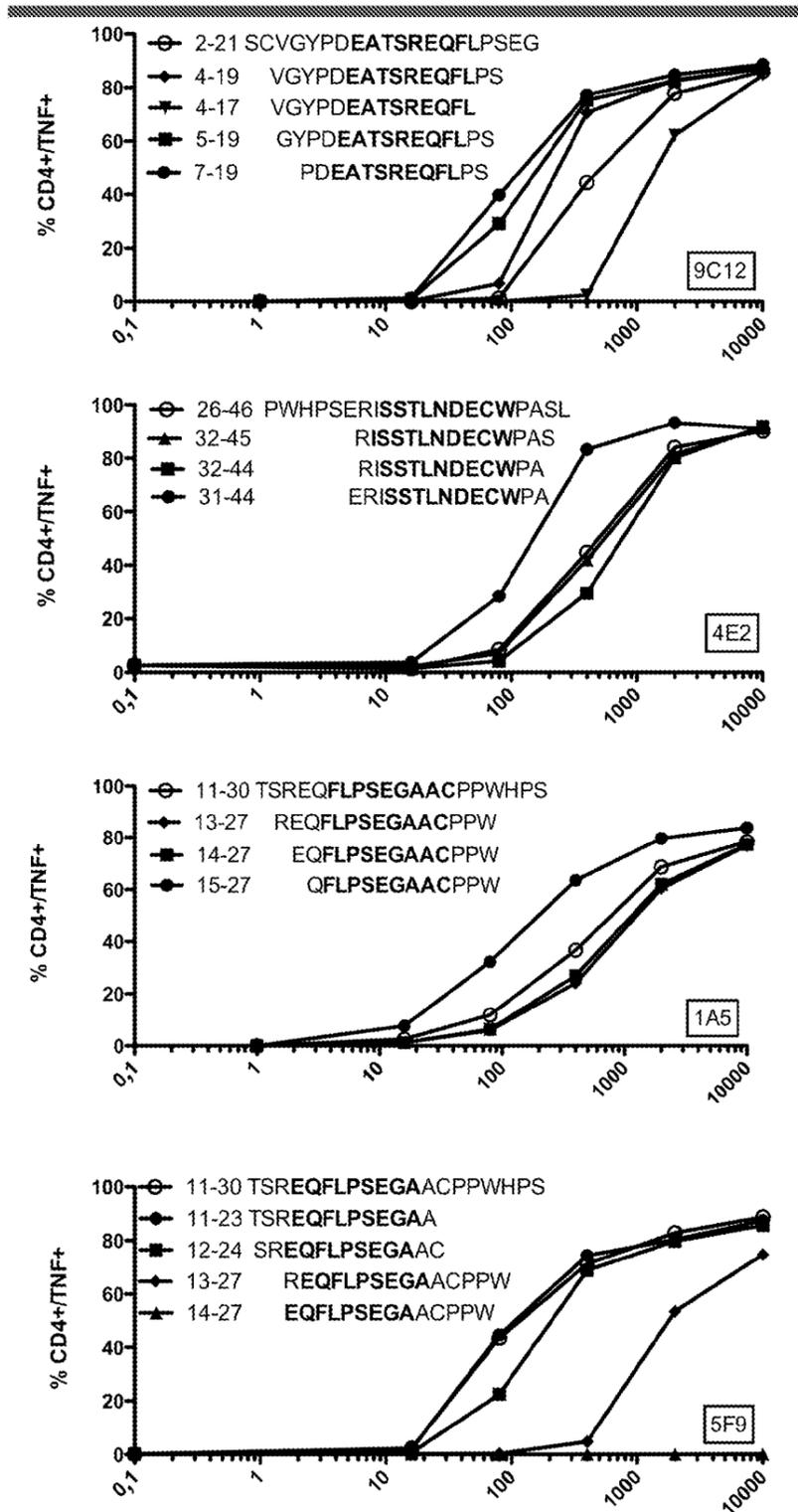


Figura 5