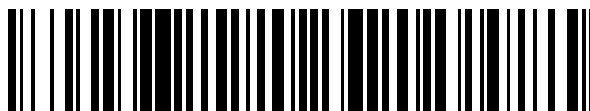


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 302**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2013 PCT/GB2013/053320**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096803**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2013 E 13811256 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2936158**

54 Título: **Método para predecir la unión fuera de diana de un péptido que se une a un péptido diana presentado por un complejo mayor de histocompatibilidad**

30 Prioridad:

21.12.2012 GB 201223172

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

01.07.2019

73 Titular/es:

**IMMUNOCORE LIMITED (50.0%)
57 Jubilee Avenue Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RX, GB y
ADAPT IMMUNE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CAMERON, BRIAN JOHN;
VUIDEPOT, ANNE LISE BRIGITTE y
JAKOBSEN, BENT KARSTEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 718 302 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

Método para predecir la unión fuera de diana de un péptido que se une a un péptido diana presentado por un complejo mayor de histocompatibilidad

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para predecir si un péptido de unión que se une a un péptido diana, preferentemente un péptido diana que se presenta en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y que está destinado a la administración en un sujeto, presentará reacción cruzada con otro péptido en el sujeto *in vivo*.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los CMH de clase I y clase II son proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas especializadas en la presentación de antígenos, con un sitio de unión de péptido polimórfico que les permite presentar un abanico diverso de fragmentos peptídicos cortos en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Los péptidos presentados por el CMH se derivan de proteínas que han sido procesadas proteosómicamente dentro de la célula. En el ser humano, las moléculas del CMH se conocen como antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés).

20 Varias inmunoterapias emergentes se basan en la administración en el sujeto que debe tratarse de un péptido de unión que se une a un complejo de péptido diana-CMH. El péptido de unión puede ser un péptido de unión inmunológico, tal como, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o un receptor de célula T o fragmento de unión a antígeno del mismo. Tales péptidos de unión se unen a una secuencia de unión que comprende la secuencia de aminoácidos del péptido diana presentado en el CMH. Con frecuencia, la secuencia de unión del péptido diana es conocida. Existe un riesgo con tales terapias de que el péptido de unión se una a péptidos diferentes del péptido diana (a los que se hace referencia en la presente memoria como "péptidos fuera de diana"), causando efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, resulta deseable identificar si existen tales péptidos fuera de diana. Esto permite seleccionar y diseñar los péptidos de unión que no se unen a péptidos fuera de diana y, en consecuencia, que la probabilidad de no provocar efectos secundarios no deseados sea mucho mayor.

30 Son motivos de efectos secundarios no deseados que se derivan de especificidades fuera de diana en la terapia de células T adaptativas: el apareamiento incorrecto de cadenas de RCT transducidas con cadenas endógenas, la mutagénesis por inserción asociada a la transducción de RCT o la aloreactividad (Amos et al., Blood 118(3):499-509, 2011; Daniel-Meshulam et al., Front Immunol. 3:186, 2012). Actualmente el modo de evitar la toxicidad fuera de diana es mediante la inclusión de genes de apoptosis para destruir las células T si aparece toxicidad después de la administración en el paciente (Restifo et al., Nat. Rev. Immunol. 12(4): 269-81, 2012).

40 De esta manera, el experto en la materia desearía proporcionar mecanismos para tratar la unión a péptidos fuera de diana después de la administración de un péptido de unión. Por lo tanto, es improbable que el experto en la materia considere la identificación de péptidos fuera de diana antes de la administración del péptido de unión. En el improbable caso de que el experto en la materia optase por este enfoque, una opción sería buscar en las bases de datos de secuencias de proteínas para péptidos similares al péptido diana presentado en el CMH. Sin embargo, esto con frecuencia devuelve un gran número de péptidos, la totalidad de los cuales necesitaría someterse a ensayo e incluso en este caso podrían no identificarse péptidos fuera de diana. La reducción de la restrictividad de los parámetros de búsqueda incrementaría adicionalmente el número de epítomos potenciales que deberían someterse a ensayo y nuevamente todavía podría no revelar péptidos fuera de diana. Alternativamente, el experto en la materia podría medir cualquier respuesta inmunológica generada por el péptido de unión en presencia de células derivadas de uno o más tejidos normales (que preferentemente no expresan el péptido diana). Sin embargo, ello puede ser un procedimiento difícil, dependiendo del número y tipo de células sometidas a ensayo. Además, las células primarias cultivadas *in vitro* pueden presentar un perfil de expresión de proteínas diferente en comparación con el mismo tipo celular *in vivo*. Esto puede resultar en una evaluación falsa de la reactividad cruzada potencial *in vivo*. Finalmente, el experto en la materia puede utilizar modelos animales para medir cualquier respuesta inmunológica generada por el péptido de unión. Debido a las diferencias entre secuencias de proteínas humanas y las de animales, la ausencia de efectos secundarios no deseados en el animal podrían no trasladarse al ser humano.

55 De esta manera, estos enfoques no indican con exactitud, especialmente al administrarlos en un sujeto, si el péptido de unión efectivamente dará lugar a efectos secundarios no deseados derivados de especificidades fuera de diana, especialmente en un contexto individualizado o personalizado. Brevemente, cualquier intento anterior para identificar péptidos fuera de diana antes de la administración del péptido de unión no presenta ninguna expectativa razonable de éxito. En efecto, tal como se explica en mayor detalle posteriormente, los inventores han encontrado que tales enfoques no necesariamente identifican los péptidos fuera de diana que causan un efecto secundario no deseado. Aunque estos enfoques se han llevado a cabo en las células T a3a descritas en los ejemplos, posteriormente, la activación fuera de diana de las células T a3a solo se pone de manifiesto al administrar el péptido de unión en los pacientes (manuscrito en preparación).

65 En la técnica anterior, Frankild et al., PLOSone, 3(e1381), 1-8, 2008, se refieren a la investigación *in silico* del papel

de la similitud peptídica en la determinación de la reactividad cruzada de las células T y concluye que la reactividad cruzada es predecible y está basada en la similitud (no la identidad) entre péptidos. Chinnasamy et al., J. Immunol, 186(2), 685-696, 2011, describen el aislamiento y desarrollo de un RCT que reconoce un péptido A3 MAGE para el propósito de la inmunoterapia del cáncer. Hausmann et al., J. Immunol., 162, 5389-5397, 1999 han examinado la relación estructura-función del reconocimiento de péptidos por dos clones de células T diferentes específicos para el péptido Tax del VLHT-1.

Descripción resumida de la invención

Por lo tanto, resulta deseable proporcionar un método alternativo para predecir si un péptido de unión se unirá, o por lo menos es probable que se una, a un péptido fuera de diana, que resuelve las desventajas de la técnica anterior.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir si un péptido de unión que se une a un péptido diana presentado por un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y está destinado a la administración en un sujeto, presenta el potencial de reaccionar cruzadamente con otro péptido en el sujeto *in vivo*, comprendiendo el método:

identificar por lo menos un motivo de unión en el péptido diana al que se une el péptido de unión, buscar los péptidos presentes en el sujeto que comprenden por lo menos un motivo de unión y que no son el péptido diana, y someter a ensayo la unión de cualquiera de tales péptidos al péptido de unión *in vitro*, en el que la presencia de uno o más de tales péptidos que se unen al péptido de unión indica que el péptido de unión presenta el potencial de reaccionar cruzadamente *in vivo*, identificando el motivo o motivos de unión mediante:

- (i) la creación de una serie de mutantes del péptido diana, presentando cada mutante el residuo aminoácido en una posición en la secuencia de unión del mismo que participa en la unión al péptido de unión sustituido por alanina o glicina, de manera que en la serie de mutantes, el residuo aminoácido en cada posición en la secuencia de unión se sustituye por alanina o glicina, y someter a ensayo cada mutante en la serie para su actividad respecto al péptido diana de tipo salvaje, en el que un residuo aminoácido en una posición dentro de la secuencia de unión se identifica como parte del motivo de unión si el mutante en el que el aminoácido en esa posición se ha mutado a alanina o glicina presenta una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje, o
- (ii) la creación de una serie de mutantes, presentando cada mutante el residuo aminoácido en una posición en la secuencia de unión sustituido por un aminoácido alternativo, de manera que, en la serie de mutantes, el residuo aminoácido en cada posición en la secuencia de unión se sustituye por todos los aminoácidos alternativos, y someter a ensayo cada mutante en la serie para su actividad respecto al péptido de tipo salvaje, en el que las sustituciones de aminoácidos que resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se considera que son aminoácidos no tolerados y no parte del motivo de unión y/o las sustituciones de aminoácidos que no resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se consideran como parte del motivo de unión.

Los métodos de la invención pueden comprender, además, donde un residuo aminoácido en una posición en la secuencia de unión no se identifica como parte del motivo de unión, la sustitución de esta posición por como mínimo un aminoácido adicional y el ensayo de actividad respecto al péptido de tipo salvaje, en el que las sustituciones de aminoácidos que resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se considera que son aminoácidos no tolerados y no parte del motivo de unión y/o las sustituciones de aminoácidos que no resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se consideran como parte del motivo de unión.

La actividad que se somete a ensayo puede ser la capacidad del mutante de unirse al péptido de unión y/o de inducir la respuesta biológica causada por la unión al péptido de unión.

El sujeto puede ser un ser humano y puede llevarse a cabo la búsqueda para péptidos que son de origen humano o de organismos que se encuentran comúnmente presentes en el ser humano.

La búsqueda puede llevarse a cabo para péptidos que se expresan en uno o más tejidos seleccionados y/o accesibles al péptido de unión.

El péptido de unión puede ser un péptido de unión inmunológico. El péptido de unión inmunológico puede ser un receptor de célula T o un anticuerpo.

Los métodos de la invención pueden comprender además el ensayo de la unión al péptido diana de cualquier péptido que se encuentra presente en el sujeto que comprenda por lo menos un motivo de unión.

En caso de ausencia de uno o más de tales péptidos y, por lo tanto, la indicación de que el péptido de unión presenta

el potencial de no reaccionar cruzadamente *in vivo*, puede administrarse en el sujeto una cantidad de tratamiento eficaz del péptido de unión en el sujeto, y/o en caso de presencia de uno o más de tales péptidos y por lo tanto una indicación de que el péptido de unión presenta el potencial de reaccionar cruzadamente *in vivo*, puede identificarse el potencial de cada péptido de causar efectos secundarios fuera de diana *in vivo* y, en caso necesario, puede prepararse un péptido de unión alternativo en el que se encuentre ausente uno o más de tales péptidos y, por lo tanto, la indicación de que el péptido de unión alternativo presenta el potencial de no reaccionar cruzadamente *in vivo* y puede administrarse en el sujeto una cantidad de tratamiento eficaz del péptido de unión alternativo.

La cantidad de tratamiento eficaz del péptido de unión es aquella cantidad proporcionada típicamente en el paciente mamífero adecuado. De esta manera, la invención comprende someter a ensayo tratamientos de péptidos de unión conocidos para el caso de que tales péptidos de unión de tratamiento se unan a péptidos diferentes del péptido diana. La cantidad de tratamiento eficaz del péptido de unión alternativo se encuentra comprendida dentro del alcance de los conocimientos del experto en la materia de la presente exposición. Por ejemplo, la cantidad de tratamiento eficaz puede determinarse mediante la comparación de las propiedades de unión y/o la capacidad de inducir la respuesta biológica de tratamiento deseada del péptido de unión con las propiedades de unión y/o la capacidad de inducir la respuesta biológica de tratamiento deseada del péptido de unión alternativo, y el ajuste de la dosis del péptido de unión basándose en la diferencia entre la unión y/o la capacidad de inducir la respuesta biológica del péptido de unión alternativo en comparación con la unión y/o la capacidad de inducir la respuesta biológica del péptido de unión. En realizaciones ventajosas, el péptido de unión alternativo presenta propiedades de unión y/o propiedades de inducción de respuesta biológica afines a las del péptido de unión y, por lo tanto, la dosis o cantidad del mismo que debe administrarse es análoga a la del péptido de unión.

Se dan a conocer estas y otras realizaciones o resultan evidentes a partir de la descripción detallada, posteriormente, o se encuentran comprendidas en la misma.

Breve descripción de los dibujos

La descripción detallada, posteriormente, proporcionada a título de ejemplo, no pretende ser limitativa de la invención a exclusivamente las realizaciones específicas descritas; podrá entenderse mejor junto con los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 muestra la producción de IFN γ por células T a3a en respuesta a células pulsadas con péptido que presentan péptido A3 MAGE (denominadas WT) o péptidos con sustitución de las alaninas.

la figura 2 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por IMCmage1 en respuesta a células pulsadas con péptido que presentan péptido A3 MAGE (denominadas WT) o péptidos con sustitución de las alaninas.

la figura 3 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por IMCmage1 en respuesta a células pulsadas con péptido que presentan péptido A3 MAGE (denominadas WT) o péptidos con sustitución de las glicinas.

La figura 4 muestra la producción de IFN γ por células T a3a en respuesta a células pulsadas con péptidos identificados en la búsqueda de motivos. Como control negativo se utilizaron células T no transducidas (ntd).

La figura 5 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por IMCmage1 en respuesta a células pulsadas con péptidos identificados en la búsqueda de motivos. Como control negativo se utilizaron experimentos llevados a cabo en ausencia de IMCmage1.

La figura 6 muestra la eliminación por células T redirigidas por IMCmage1 de células pulsadas con péptidos A3 MAGE o Titina. Se determinó la eliminación celular utilizando la plataforma IncuCyte. Se preparó un control negativo con ausencia de IMCmage1 (E + T).

La figura 7 muestra el perfil de citoquinas de células T a3a en presencia de células iCells, determinado mediante el ensayo Luminex. Se utilizaron células EJM y colo205 como controles positivo y negativo, respectivamente.

La figura 8 muestra imágenes de contraste de fases obtenidas utilizando la plataforma IncuCyte, de células positivas para Titina que están siendo eliminadas por células T a3a. Las imágenes se obtuvieron después de 24 horas de incubación. Como control negativo se utilizaron células T no transducidas (ntd).

La figura 9 muestra detalles de 15 péptidos identificados en una búsqueda de BLAST llevada a cabo para encontrar péptidos humanos con una secuencia similar a la del péptido A3 MAGE. Se indica la activación de las células T a3a o células T redirigidas por IMCmage1, determinada mediante IFN γ ELISpot.

La figura 10 muestra la activación de células T a3a, determinada mediante IFN γ ELISpot, en respuesta a células pulsadas con péptido que presentan A3 MAGE, Titina humano o Titina de ratón.

la figura 11 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por ImmTAC-NYESO en respuesta a células pulsadas con péptido que presentan péptido NY-ESO-1 (denominadas WT) o péptidos con sustitución de las alaninas.

La figura 12 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por ImmTAC-NYESO en respuesta a péptido NY-ESO-1 nativo (WT) y cada péptido con sustitución de aminoácido.

Descripción detallada

Los inventores han encontrado que, mediante la identificación del motivo de unión en el péptido diana al que se une el péptido de unión, y no la secuencia de unión conocida, pueden identificarse con mucha mayor precisión péptidos

fuera de diana que presenta el potencial o que reaccionarán cruzadamente *in vivo*. Si se encuentran péptidos fuera de diana, ello permite alterar los péptidos de unión de manera que no se unan a estos péptidos fuera de diana.

5 El motivo o motivos de unión pueden identificarse creando una serie de mutantes del péptido diana, presentando cada mutante el residuo aminoácido en una posición en la secuencia del mismo que participa en la unión al péptido de unión (la "secuencia de unión") sustituido por alanina o glicina, de manera que, en la serie de mutantes, el residuo aminoácido en cada posición en la secuencia de unión se ha sustituido por alanina o glicina. Cada mutante en la serie seguidamente se somete a ensayo para su actividad respecto a la del péptido diana de tipo salvaje. Puede identificarse un residuo aminoácido en una posición dentro de la secuencia de unión como parte del motivo de unión si el mutante
10 en que el aminoácido en esa posición se ha mutado a alanina o glicina presenta una pérdida de actividad de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje. Esto puede resultar en un motivo de unión que comprende uno o más aminoácidos en una o una pluralidad de posiciones (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) dentro de la secuencia de unión que se está identificando.

15 En el caso de que un residuo aminoácido en una posición en la secuencia de unión no se identifique como parte del motivo de unión (utilizando las técnicas descritas anteriormente, por ejemplo), esta posición puede sustituirse adicionalmente por como mínimo un aminoácido adicional y someterse a ensayo para actividad respecto al péptido de tipo salvaje. Las sustituciones de aminoácidos que resultan en una pérdida de actividad de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se consideran aminoácidos no tolerados y/o no parte del
20 motivo de unión. A la inversa, las sustituciones de aminoácidos que no resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje pueden considerarse parte del motivo de unión. Esto puede resultar en un motivo de unión tal como se ha definido anteriormente y adicionalmente en que uno o una pluralidad de posiciones están representadas por uno, aunque no todos los aminoácidos.

25 Alternativa o adicionalmente, puede generarse una serie de mutantes en la que el residuo aminoácido en cada posición de la secuencia de unión se muta a todos los aminoácidos alternativos (respecto al aminoácido de tipo salvaje). Para una secuencia de unión de nueve aminoácidos, lo anterior significaría 171 péptidos. Cada mutante en la serie se somete a ensayo para actividad respecto al péptido de tipo salvaje. Las sustituciones de aminoácidos que resultan en una pérdida de actividad de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se
30 consideran aminoácidos no tolerados y/o no parte del motivo de unión. A la inversa, las sustituciones de aminoácidos que no resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje pueden considerarse parte del motivo de unión. Esto puede resultar en un motivo de unión en el que cada posición está representada por como mínimo uno, aunque no todos los aminoácidos.

35 La actividad que se somete a ensayo puede ser la capacidad del mutante de unirse al péptido de unión (esto puede medirse mediante resonancia del plasmón superficial, por ejemplo) y/o de inducir la respuesta biológica causada por la unión al péptido de unión. La respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la activación de células del sistema inmunológico, tales como células T, medida por la producción de citoquinas o la destrucción de la célula diana; la
40 activación de un enzima, medida por la acumulación de producto o por la desaparición de sustrato, o la activación de una cascada de señalización (medida mediante monitorización de la fosforilación de las proteínas, o cambios en la expresión génica y la producción de proteínas).

45 Se conocen técnicas, conocidas como "escaneo de aminoácidos", que han sido utilizadas para determinar un motivo de unión. Ver Wells, *Methods Enzymol.* 202: 390-411, 1991, por ejemplo. También se conoce un enfoque similar para detectar otras especificidades de un receptor de células T (por ejemplo, Udyavar et al., *J. Immunol.* 182(7):4439-47, 2009). Sin embargo, dicho escaneo de aminoácidos no se ha utilizado para identificar los péptidos fuera de diana que pueden causar efectos secundarios no deseables.

50 Una vez se ha identificado el motivo de unión, pueden realizarse búsquedas en bases de datos de proteínas para encontrar proteínas que contienen el motivo de unión. Entre las bases de datos de proteínas adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/>), Protein Information Resource (PIR) (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/index.shtml>) y/o Reference Sequence (RefSeq) (www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq).

55 La búsqueda de un motivo peptídico puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de entre varias herramientas, las cuales pueden encontrarse en sitios de recursos bioinformáticos tales como ExPASY (<http://www.expasy.org/>). Por ejemplo, la herramienta de búsqueda ScanProsite identifica motivos definidos por el usuario en todas las secuencias de proteína en la base de conocimientos de proteínas UniProtKB/Swiss-Prot (De Castro et al. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio, 2006; 34 (Web Server issue):W362-5).

60 Resulta preferente identificar los péptidos que contienen el motivo de unión exacto, es decir, con 100% de identidad respecto al motivo de unión. Sin embargo, pueden identificarse las proteínas que contienen motivos que presentan menos de 100% de identidad respecto al motivo de unión. Para los fines de la búsqueda, el motivo de unión puede modificarse para incluir ambigüedad en determinadas posiciones, por ejemplo con aminoácidos que presentan
65 propiedades similares (p.ej., leucina/isoleucina, etc.) o donde ya es conocido en la literatura que un aminoácido particular resulta tolerado en una posición determinada (tal como residuos de anclaje de HLA).

La búsqueda puede llevarse a cabo para péptidos que son de origen humano o de organismos que se encuentran comúnmente presentes en el ser humano, tales como patógenos víricos o bacterianos, o bacterias comensales. Sin embargo, en donde el método de la presente invención se aplica en animales no humanos, tales como mamíferos no humanos, la búsqueda puede llevarse a cabo para péptidos que son de origen animal no humano relevante o de organismos que se encuentran comúnmente presentes en dichos animales no humanos. Adicional o alternativamente, la búsqueda puede llevarse a cabo para péptidos que se expresan en uno o más tejidos seleccionados y/o que son accesibles al péptido de unión. Dicha información puede obtenerse de la literatura.

Los péptidos identificados en la búsqueda como comprendiendo el motivo o motivos de unión pueden confirmarse como péptido fuera de diana y de reacción cruzada con el péptido de unión mediante la determinación de la capacidad del péptido identificado de unirse al péptido de unión (por ejemplo, utilizando resonancia de plasmón superficial) o evaluando la respuesta biológica generada por la unión del péptido de unión al péptido identificado. La respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la activación de células del sistema inmunológico, tales como células T, medida por la producción de citoquinas o la destrucción de la célula diana; la activación de un enzima, medida por la acumulación de producto o por la desaparición de sustrato, o la activación de una cascada de señalización (medida mediante monitorización de la fosforilación de las proteínas, o cambios en la expresión génica y la producción de proteínas).

Tras la identificación de uno o más péptidos fuera de diana, puede determinarse el potencial del péptido fuera de diana, o de cada péptido fuera de diana, de causar efectos secundarios no deseados al unirse al péptido de unión. Esto puede incluir la búsqueda en fuentes de la literatura para determinar la expresión del péptido fuera de diana en tejido normal. Por ejemplo, en el caso de que la expresión del péptido fuera de diana en tejido normal sea no existente o limitada (por ejemplo, antígenos testiculares de cáncer), el péptido de unión puede considerarse adecuado para la administración *in vivo*. En casos en que la expresión del péptido fuera de diana en tejido normal es generalizada o se produce en tejidos críticos, tales como las células cardíacas, la unión opcionalmente puede confirmarse adicionalmente *in vitro* utilizando células que expresan el péptido fuera de diana. En algunas situaciones, el péptido de unión no puede administrarse *in vivo* debido a la reacción cruzada que ello puede ocasionar. El péptido de unión puede rediseñarse de manera que ya no se produzca reactividad cruzada con el péptido o péptidos fuera de diana, manteniendo simultáneamente la unión, preferentemente con alta afinidad, al péptido diana. Por ejemplo, los receptores de células T pueden rediseñarse mediante mutagénesis utilizando los métodos descritos en el documento n° WO 03/020763. En donde el rediseño no impida la reactividad cruzada con el péptido fuera de diana, puede buscarse un péptido de unión alternativo, por ejemplo un receptor de célula T alternativo, que se una al péptido diana.

Si no se encuentran péptidos fuera de diana, o si la unión a los péptidos fuera de diana no se espera que provoque efectos secundarios no deseados (por ejemplo, en virtud de que el péptido fuera de diana se expresa en tejidos limitados o no críticos), el péptido de unión puede utilizarse en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad o condición que se mejora mediante la administración del péptido de unión. Entre los métodos de tratamiento se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, inmunoterapias; por ejemplo, la administración en un paciente de células T modificadas (terapia adaptativa), tales como las transducidas con receptores de células T de afinidad potenciada o receptores de anticuerpos quiméricos, la administración de anticuerpos monoclonales o de fragmentos de anticuerpos monoclonales, especialmente anticuerpos de tipo RCT; la administración de nuevos agentes inmunoterapéuticos biespecíficos, tales como ImmTAC (RCT inmunomovilizadores contra el cáncer) (Liddy et al., Nat. Med. 18: 980-987, 2012) o BiTEs (por sus siglas en inglés, anticuerpos acopladores biespecíficos de células T) (Baeuerle et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 11(1): 22-30, 2009).

Dichos tratamientos pueden proporcionarse en una composición farmacéutica junto con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los RCT o células terapéuticas habitualmente se suministran como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluye un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede encontrarse en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración de la misma en el paciente). Puede proporcionarse en forma de dosis unitaria, generalmente se proporciona en un recipiente sellado y puede proporcionarse como parte de un kit. Dicho kit normalmente (aunque no necesariamente) incluiría instrucciones de utilización. Puede incluir una pluralidad de dichas formas de dosis unitaria.

La composición farmacéutica puede adaptarse para la administración por cualquier vía apropiada, tal como una vía parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular o intravenosa).

Dichas composiciones pueden prepararse mediante cualquier método conocido de la técnica farmacéutica, por ejemplo mediante la mezcla del ingrediente activo con el portador o portadores, o excipiente o excipientes, bajo condiciones de esterilidad.

Las dosis de las sustancias de la presente exposición pueden variar entre amplios límites, dependiendo de la enfermedad o trastorno que debe tratarse, la edad y condición del individuo que debe tratarse, etc.; por ejemplo, un intervalo de dosis adecuado para un reactivo ImmTAC puede ser de entre 25 ng/kg y 50 µg/kg. Un médico determinará finalmente las dosis apropiadas que deben utilizarse.

En el método de la presente invención, el péptido de unión que se une al péptido presentado en el CMH puede ser un

péptido de unión inmunológico, que puede ser un péptido inmunoterapéutico. Los péptidos de unión pueden obtenerse de fuentes naturales, o pueden producirse parcial o totalmente mediante síntesis. Entre los ejemplos de los péptidos de unión inmunológicos se incluyen receptores de células T ("RCT", término que incluye fragmentos de unión a antígeno de receptores de células T). Tal como se describe en el documento nº WO 99/60120, los RCT median en el reconocimiento de complejos específicos de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)-péptido por células T y, de esta manera, resultan esenciales para el funcionamiento del brazo celular del sistema inmunológico. El RCT es una proteína de superficie celular heterodimérica de la superfamilia de inmunoglobulinas que está asociada a proteínas invariantes del complejo CD3 implicado en mediar en la transducción de señales. Los RCT existen en formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que son estructuralmente similares, aunque las células T que los expresan presentan localizaciones anatómicas, y probablemente funciones, bastante diferentes. La parte extracelular del receptor consiste en dos dominios constantes próximos a la membrana y dos dominios variables distales respecto a la membrana portadores de bucles polimórficos análogos a las regiones determinantes de complementariedad (RDC) de los anticuerpos. Estos bucles son los forman el sitio de unión de la molécula de RCT y determinan la especificidad peptídica.

El RCT puede encontrarse en forma soluble (p.ej., sin dominios transmembranales o citoplasmáticos), por ejemplo un RCT monoclonal tal como se describe en el documento nº WO03/020763 y/o en forma de cadena sencilla, tal como se describe en el documento nº WO2004/033685. Para la estabilidad, los RCT solubles preferentemente presentan un enlace disulfuro introducido entre los residuos de los dominios constantes respectivos, tal como se describe en, por ejemplo, el documento nº WO 03/020763. Entre los formatos de cadena sencilla se incluyen polipéptidos RCT $\alpha\beta$ de los tipos $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$ o $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β , en los que $V\alpha$ y $V\beta$ son regiones variables α y β de RCT, respectivamente; C α y C β son regiones constantes α y β de RCT, respectivamente, y L es una secuencia conectora. Alternativa o adicionalmente, el RCT puede fusionarse con un dominio efector inmunológico para la utilización como agente de localización para la administración de agentes terapéuticos en una célula presentadora de antígeno. Entre dichos agentes terapéuticos se incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tales como un fragmento anti-CD3, inmunomoduladores tales como citoquinas, enzimas tales como perforina, o agentes quimioterapéuticos, tales como cisplatino. Los RCT también pueden expresarse sobre una célula, tal como una célula T. Dichas células T pueden utilizarse en terapia adaptativa.

En el método de la presente invención, los péptidos de unión pueden ser anticuerpos, tales como anticuerpos de tipo RCT, que han sido manipulados para unirse a péptidos presentados en CMH (por ejemplo, ver Sergeeva A. G. et al. (2011), *Blood* 117(16): 4262-72 y/o Dahan, R. e Y. Reiter (2012), *Expert Rev. Mol. Med.* 14:e6. El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno, naturales o producidos parcial o totalmente mediante síntesis. El término cubre además cualquier polipéptido o proteína con un dominio de unión que es, o es homólogo respecto a, un dominio de unión a anticuerpo. Son ejemplos de anticuerpos los isotipos de inmunoglobulina (p.ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) y sus subclases isotípicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión a antígeno, tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo monoclonal puede denominarse en la presente memoria 'mab'.

Resulta posible a partir de anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos utilizar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas químicas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de ADN codificante de la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (RDC) de un anticuerpo respecto a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Ver, por ejemplo, los documentos nº EP-A-184187, nº GB 2188638A o nº EP-A-239400. Un hibridoma u otra célula productora de un anticuerpo puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Debido a que los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, el término "anticuerpo" debe interpretarse como cubriendo fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, anticuerpos humanizados, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, sea natural, o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se fusionan moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos nº EP-A-0120694 y nº EP-A-0125023. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo modificado que presentan las regiones variables de un anticuerpo no humano, p.ej. Murino, y la región constante de un anticuerpo humano. Los métodos para preparar anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, la patente US nº 5225539.

Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo completo puede realizar la función de antígenos de unión. Son ejemplos de fragmentos de unión: (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo, (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., *Nature* 341:544-546, 1989) que consiste en un dominio VH, (v) regiones RDC, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos, (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL se unen mediante un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien formando un sitio de unión a antígeno (Bird et al., *Science*

242:423-426, 1988; Huston et al., PNAS USA 85:5879-5883, 1988); (viii) dímeros de Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento nº PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión génica (documento nº WO94/13804; P. Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993). Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando los dos dominios unidos (p.ej., mediante un conector peptídico) pero siendo incapaces de asociarse entre sí para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de unión a antígeno se forman mediante la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (documento nº WO94/13804). En el caso de que deban utilizarse anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, los cuales pueden fabricarse de una diversidad de maneras (Hollinger y Winter, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, 1993), p.ej., prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos indicados anteriormente. Puede resultar preferible utilizar dímeros de scFv o diacuerpos en lugar de anticuerpos completos. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, utilizando únicamente dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica. Entre otras formas de anticuerpos biespecíficos se incluyen las "Janusinas" de cadena sencilla descritas en Traunecker et al., EMBO Journal 10:3655-3659, 1991. Los diacuerpos biespecíficos, al contrario que los anticuerpos completos biespecíficos, también pueden resultar útiles debido a que pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse fácilmente utilizando la expresión fágica (documento nº WO94/13804) a partir de bibliotecas. En el caso de que un brazo del diacuerpo deba mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, puede generarse una biblioteca en la que se modifica el otro brazo y seleccionarse un anticuerpo de la especificidad apropiada. La expresión "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. En el caso de que un antígeno sea grande, un anticuerpo podría sólo unirse a una parte particular del antígeno, parte que se denomina epítipo. Puede proporcionarse un dominio de unión a antígeno mediante uno o más dominios variables de anticuerpo. Un dominio de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo.

En el método de la presente invención, los péptidos de unión pueden ser péptidos de unión que se unen a los péptidos presentados por el CMH y se basan en andamiajes de proteínas contruidos. Los andamiajes de proteínas se derivan de estructuras de proteínas naturales, solubles y estables, que han sido modificadas para proporcionar un sitio de unión para una molécula diana de interés. Entre los ejemplos de andamiajes de proteínas contruidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aficuerpos, los cuales se basan en el dominio Z de la proteína A estafilocócica que proporciona una interfaz de unión en dos de sus hélices- α (Nygren P.A. (2008), FEBS J 275(11): 2668-76); anticalinas, derivadas de lipocalinas, que incorporan sitios de unión para ligandos pequeños en el extremo abierto de un pliegue de barril beta (Skerra, A. (2008), FEBS J. 275(11): 2677-83), nanocuerpos y DARPs. Los andamiajes de proteínas contruidos típicamente están dirigidos a la unión de las mismas proteínas antigénicas que los anticuerpos y son potenciales agentes terapéuticos. Pueden actuar como inhibidores o antagonistas, o como vehículos de administración para dirigir moléculas, tales como toxinas, a un tejido específico *in vivo* (Gebauer M. y A. Skerra (2009), Curr. Opin. Chem. Biol. 13(3): 245-55). También pueden utilizarse péptidos cortos para unirse a una proteína diana. Los filómeros son péptidos estructurados naturales que se derivan de genomas bacterianos. Dichos péptidos representan un amplio abanico de pliegues estructurales de proteínas y pueden utilizarse para inhibir/interrumpir las interacciones proteína-proteína *in vivo* (Watt P.M. (2006), Nat. Biotechnol. 24(2): 177-83).

Ejemplos

A continuación, se describe la presente invención haciendo referencia a los ejemplos no limitativos a continuación.

50 Ejemplo 1

El péptido diana presentado en CMH utilizado en el presente ejemplo se deriva del antígeno testicular de cáncer humano A3 MAGE y presenta la secuencia de aminoácidos siguiente: EVDPIGHLY. El péptido A3 MAGE se presenta sobre las células presentadoras de antígeno en el contexto de HLA-A*01.

El péptido de unión utilizado en el presente ejemplo comprende un receptor de célula T (RCT) modificado que ha sido contruido para poseer una afinidad potenciada para el péptido A3 MAGE. Los métodos para producir RCT de afinidad potenciada son conocidos en la técnica (por ejemplo, la expresión fágica; documento nº WO 03/020763). El RCT A3 MAGE nativo se obtuvo a partir de un clon de células T A3 MAGE, tal como se indica en el documento nº WO2012/013913. Se utilizan dos versiones del RCT A3 MAGE modificado. Una versión de afinidad moderadamente potenciada, expresada por células T transducidas (denominadas células T a3a) se describe en el documento nº WO2012/013913, y una versión de afinidad elevada, producida como proteína soluble fusionada con un fragmento anti-CD3 activador de células T (denominado IMCmage1), según el método del documento nº WO2010/133828.

65 1.1 Identificación del motivo de unión

Se obtuvieron variantes del péptido A3 MAGE nativo en el que cada posición aminoácido se substituyó secuencialmente por alanina, tal como se muestra posteriormente (en cada caso, la substitución por alanina se encuentra subrayada). Los péptidos se obtuvieron de Peptide Protein Research Limited, Reino Unido.

5

A V D P I G H L Y
 E A D P I G H L Y
 E V A P I G H L Y
 E V D A I G H L Y
 E V D P A G H L Y
 E V D P I A H L Y
 E V D P I G A L Y
 E V D P I G H A Y
 E V D P I G H L A

Los péptidos nativos y con substitución de alaninas se agregaron a células presentadoras de antígenos y se utilizó la producción de interferón γ (IFN γ), medida utilizando el ensayo ELISpot, como lectura de la activación de las células T. Se definieron las posiciones esenciales por una reducción superior a 50% de la actividad de las células T en comparación con el péptido nativo.

10

1.1a) Activación de las células T 3a3 por péptidos con substitución de alaninas

Se llevaron a cabo ensayos ELISpot siguiendo las instrucciones del fabricante (BD BioSciences). Se utilizaron células hepatocitos HLA-A1⁺ como células diana y se pulsaron con 10 μ M de cada péptido. Se contaron las células diana y se sembraron en placas con 50.000 células en cada pocillo en 50 μ l de tampón de ensayo (10% de FCS, 88% de RPMI 1640, 1% de glutamina y 1% de penicilina/estreptomocina). Las células T efectoras utilizadas en este método eran una mezcla 1:1 de células T CD4⁺ y CD8⁺ (obtenidas mediante selección negativa (utilizando los kits de aislamiento CD4 y CD8 negativos, Dynal) procedentes de linfocitos de sangre periférica (PBL, por sus siglas en inglés) obtenidos de un donante sano). Las células se estimularon con perlas recubiertas con anti-CD3/CD28 (T cell expander, Invitrogen), se transdujeron con lentivirus portador del gen codificante de receptor de células T α 3a y se expandieron en medio de ensayo que contenía 50 U/ml de IL-2 hasta 10 a 13 días después de la transducción. Las células T efectoras se sembraron en una placa a razón de 15.000 células por pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C/5% de CO₂ y se cuantificaron, tras desarrollarse, utilizando un lector ELISpot automático (analizador Immunospot Serie 5, Cellular Technology Ltd.). Las células PBL no transducidas del mismo donante sano se utilizaron como control negativo. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

20

25

La figura 1 muestra la producción de IFN γ por células T transducidas con α 3a en respuesta a péptido A3 IMAGE nativo (wt) y cada péptido con substitución de alaninas. Cinco de los péptidos con substitución de alaninas resultaron en una reducción mayor al 50% en la producción de IFN γ en comparación con el péptido A3 MAGE nativo. El residuo nativo correspondiente en cada una de estas cinco posiciones comprendía el motivo de unión. En este caso, el motivo de unión se define como EXDPIXXX γ , en donde X es cualquier aminoácido.

30

35 1.1b) Activación de células T redirigidas por IMCmage1 por péptidos con substitución de alaninas

Se llevaron a cabo ensayos Elispot tal como se ha indicado en la sección (1.1a), excepto en que las células efectoras se prepararon a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aplicando procedimientos estándares utilizando Lymphoprep (Axis-Shields, nº de cat. NYC-1114547) y tubos Leucosep (Greiner, nº de cat. 227290) y se sembraron en placa a razón de 25.000 células en cada pocillo. Se añadió IMCmage1 hasta una concentración final de 0,1 nM en cada pocillo. Los controles se llevaron a cabo en ausencia de IMCmage1 (efectores + dianas + péptido) y en ausencia de células diana pulsadas con péptido (efectores + IMCmage 1).

40

La figura 2 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por IMCmage1 en respuesta a péptido A3 IMAGE nativo (wt) y cada péptido con substitución de alaninas. Cinco de los péptidos con substitución de alaninas resultaron en una reducción mayor al 50% en la producción de IFN γ en comparación con el péptido A3 MAGE nativo. El residuo nativo correspondiente en cada una de estas cinco posiciones comprendía el motivo de unión. En este caso, el motivo de unión se define como EXDPIXXX γ , en donde X es cualquier aminoácido.

45

50 1.1c) Activación de células T redirigidas por IMCmage1 por péptidos con substitución de glicinas

Se siguió el mismo procedimiento que el detallado en la sección (1.1b), excepto en que las células diana hepatocitos HLA-A*01 se pulsaron con péptidos con sustitución de glicinas. El péptido a3 MAGE contiene un residuo de glicina nativo; en este caso, la glicina nativa se considera no esencial para los fines de definir el motivo.

La figura 3 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por IMCmage1 en respuesta a péptido A3 IMAGE nativo (wt) y cada péptido con sustitución de glicinas. Cinco de los péptidos con sustitución de glicinas resultaron en una reducción mayor al 50% en la producción de IFN γ en comparación con el péptido A3 MAGE nativo. El residuo nativo correspondiente en cada una de estas cinco posiciones comprendía el motivo de unión. En este caso, el motivo de unión se define como EXDPXXXXY, en donde X es cualquier aminoácido.

1.2 Identificación de péptidos fuera de diana potenciales

La herramienta ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>) se utilizó para buscar todas las secuencias de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (versión 2012_10 de 31-oct-12: 538259 entradas) para proteínas que contienen el motivo identificado anteriormente (introducido como E-X-D-P-I-X-X-Y). No se utilizaron filtros. Las opciones de patrón se fijaron para permitir como máximo la correspondencia de 1 X caracteres de secuencia con una posición conservada en el patrón y el modo de búsqueda se fijó en 'voraz, solapamientos, no incluye'.

Se han identificado cinco proteínas humanas únicas: A3 MAGE nativa, los miembros de la familia de MAGE A6 y B18, la proteína muscular Titina y una proteína conocida como Dos. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos que contienen motivo se muestran en la tabla a continuación (los residuos que comprenden el motivo están subrayados).

Proteína (número de acceso)	Secuencia									
A3 MAGE (P43357)	<u>E</u>	V	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	G	H	L	<u>Y</u>	
A6 MAGE (P43360)	<u>E</u>	V	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	G	H	V	<u>Y</u>	
B18 MAGE (Q96M61)	<u>E</u>	V	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	R	H	Y	<u>Y</u>	
Titina (Q8WZ42)	<u>E</u>	S	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	V	A	Q	<u>Y</u>	
Dos (Q8N350)	<u>E</u>	P	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	L	D	N	<u>Y</u>	

Los resultados de la búsqueda también identifican varios péptidos que contienen motivos procedentes de patógenos humanos comunes. Se seleccionaron dos péptidos de la lista como ejemplos para el ensayo adicional: una proteína nucleasa presente en tres cepas de virus de Epstein Barr (VEB) y un factor de maduración ribosómica de *Clostridium difficile*; las secuencias de aminoácidos de estos péptidos se muestran a continuación.

Proteína (número de acceso)	Secuencia									
proteína del VEB (Q1HVE7) (P03217) (Q3KSR5)	<u>E</u>	F	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	Y	P	S	<u>Y</u>	
proteína de <i>C. difficile</i> (Q18BH3)	<u>E</u>	K	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	K	E	N	<u>Y</u>	

1.3 Confirmación de la reactividad cruzada de péptidos fuera de diana

Los péptidos fuera de diana potenciales, identificados anteriormente, se sometieron a ensayo para su capacidad de reaccionar cruzadamente con células T a3a y células T redirigidas por IMCmage1 utilizando un ensayo ELISpot de IFN γ .

1.3a) Ensayo de activación de células T 3a3 por células hepatocitos HLA-A*01 pulsadas con péptidos fuera de diana potenciales

Todos los péptidos fueron producidos sintéticamente por Peptide Protein Research Limited, Reino Unido. La activación de las células T a3a se determinó mediante ensayo ELISpot IFN γ utilizando el mismo procedimiento que el descrito en la sección 1.1a. Se utilizaron células hepatocitos HLA-A*01 como dianas y se pulsaron con 10 μ M de cada péptido. Las células T se prepararon a partir de linfocitos de sangre periférica (PBL) obtenidas de un donante sano y se transdujeron con el RCT a3a. Se utilizaron células T donantes no transducidas como control negativo. La activación de las células T en respuesta a células pulsadas con cada uno de los péptidos que contienen motivo se comparó con la activación por células pulsadas con péptido A3 MAGE.

La figura 4 muestra que las células pulsadas con A3 MAGE, A6 MAGE, B18 MAGE y péptidos Titina condujeron a la activación de las células T a3a. El péptido Dos, así como los péptidos del VEB y de *C. difficile* no indujeron la activación de las células T.

1.3b) Ensayo de activación de células T redirigidas por IMCmage1 por células hepatocitos HLA-A*01 pulsadas con péptidos fuera de diana potenciales

Las células pulsadas con péptido se prepararon tal como se indica en 1.3a. La activación de las células T redirigidas por IMCmage1 se determinó mediante ensayo ELISpot IFN γ utilizando el mismo procedimiento que el descrito en la sección 1.1b.

5 La figura 5 muestra que las células pulsadas con los péptidos A3 MAGE, A6 MAGE, B18 MAGE y Titina condujeron a la activación de las células T redirigidas por IMCmage1. El péptido Dos, así como los péptidos del VEB y de *C. difficile* no indujeron la activación de las células T.

10 Los experimentos descritos en 1.3a y 1.3b confirman que existen tres péptidos fuera de diana que se unen a las células T a3a y a células T redirigidas por IMCmage1, A6 MAGE, B18 MAGE y Titina. De los tres, sólo Titina es relevante en un contexto clínico. La expresión normal en tejidos de las proteínas de la familia MAGE se encuentra restringida a las células de la línea germinal masculina, mientras que Titina se expresa en músculo cardíaco y esquelético (base de conocimiento de proteínas Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot>)).

15 *1.3c) Medición de la afinidad para péptidos activadores de células T*

Se determinó la afinidad mediante resonancia del plasmón superficial utilizando un instrumento BIAcore 3000 y se expresa en términos de una constante de equilibrio de disociación (K_D). Se prepararon versiones solubles de los RCT a3a e IMCmage1 utilizando el método descrito en Boulter et al., Protein Eng. 16: 707-711, 2003. Se prepararon monómeros pCMH específicos biotinilados y de control tal como se describe en Garboczi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3429-3433, 1992 y O'Callaghan et al., Anal. Biochem. 266: 9-15, 1999, e inmovilizados sobre un chip sensor CM-5 acoplado con estreptavidina. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C en tampón PBS (Sigma) complementado con Tween al 0,005% (Sigma) a un caudal constante. Para medir la afinidad, se hicieron flujos diluciones en serie de los RCT solubles sobre los pCMH inmovilizados y se determinaron los valores de respuesta en el equilibrio para cada concentración. Se determinaron las constantes de equilibrio de disociación (K_D) mediante la representación de la unión de equilibrio específica frente a la concentración de proteína, seguido de un ajuste por cuadrados mínimos a la ecuación de unión de Langmuir suponiendo una interacción 1:1.

30 Los resultados resumidos en la tabla a continuación confirman que el péptido Titina se une a versiones solubles de los RCT utilizados en las células T a3a e IMCmage1. La afinidad (K_D) se muestra en la tabla a continuación:

	A3-MAGE (EVDPIGHLY)	A6-MAGE (EVDPIGHVY)	B18-MAGE (EVDPIRHYY)	Titina (ESDPIVAQY)
IMCmage1	4,5 nM	4,2 nM	182 nM	86 nM
a3a MAGE	~2 μ M	~2 μ M	~100 μ M	~100 μ M

35 *1.3d) Citotoxicidad de células T redirigidas por IMCmage1 para células hepatocitos HLA-A*01 pulsadas con péptido titina*

Se llevaron a cabo ensayos de eliminación celular utilizando la plataforma FLR IncuCyte (Essen Biosciences). Para los ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano. El medio de ensayo era RPMI (sin rojo fenol + FCS al 10% + Pen/strep al 1% + Glu al 1%). Se sembraron células hepatocitos HLA-A*01 a razón de 10.000 células por pocillo y se incubaron durante la noche para permitir que se adhiriesen. Se prepararon los péptidos a una concentración final de 10 μ M y se añadieron 25 μ l (60 μ M) a cada pocillo. Las células T efectoras (preparadas tal como se describe en 1.1b) se descongelaron a partir de N₂ líquido, se contaron y se sembraron a razón de 100.000/pocillo. Se añadió IMCmage1 hasta una concentración final de 1 nM. Se llevaron a cabo mediciones de control en ausencia de IMCmage1 (efectores + dianas). Las imágenes se captaron cada 2 h, durante un periodo de tres días y se cuantificó el número de células apoptóticas por mm² utilizando el reactivo cinético caspasa 3/7 CellPlayer 96-well y la plataforma de FLR IncuCyte. El reactivo se cortó con caspasa 3/7 activada con la apoptosis de la célula diana, resultando en la liberación del pigmento y la tinción fluorescente verde del ADN nuclear.

50 La figura 6 muestra que las células T redirigidas por IMCmage1 eliminan las células pulsadas con péptido Titina en un grado similar a A3 MAGE nativo.

1.3e) Activación de células T a3a por células que presentan naturalmente péptido titina

55 Se obtuvieron cardiomiocitos iCell de Cellular Dynamics International. Los cardiomiocitos iCell son cardiomiocitos humanos altamente purificados derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPS, por sus siglas en inglés) y son eléctricamente activas con características mecánicas típicas del tejido cardíaco. Estas células son positivas para Titina y negativas para A3 MAGE según se determina mediante métodos de RT-PCR estándares.

60 Los cardiomiocitos iCell se revivieron a partir de nitrógeno líquido y se sembraron a razón de 50.000 células por pocillo cuatro días antes del ensayo y se trataron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cardiomiocitos iCell se transdujeron víricamente con HLA-A*01. Se sembraron EJM y colo205 (controles positivos y negativos, respectivamente) a razón de 50.000 células por pocillo el día del ensayo. Los cardiomiocitos iCell se lavaron una vez con R10 (RPMI + FCS al 10% + Pen/Strep al 1% + Glu al 1%) y después se incubaron en R10 para el ensayo. Las

células T transducidas con a3a y las células no transducidas correspondientes se obtuvieron del cultivo y se sembraron en placa a razón de 50.000 células por pocillo. Las células se cultivaron durante 24 h y después se centrifugaron a 800xg durante 5 min. A continuación, se extrajeron 100 µl de sobrenadante y se aplicaron a una placa nueva. Las placas se almacenaron a -70°C hasta la descongelación y revelado para medir la liberación de múltiples citoquinas (IFN γ , GM-CSF y MIP-1 β) mediante Luminex (kit 25-plex), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La figura 7 muestra que las células T a3a liberan IFN γ , GM-CSF y MIP-1 β en respuesta a cardiomiocitos iCell.

1.3f) *Eliminación de células que presentan naturalmente péptido Tin por células T a3a*

Se obtuvieron imágenes de contraste de fases tras 24 h en la plataforma de FLR IncuCyte (Essen Biosciences) utilizando la misma configuración experimental que la descrita anteriormente (1.3e). La figura 8 muestra las imágenes resultantes obtenidas. En presencia de células T a3a, las iCells resultaron destruidas.

Ejemplo comparativo 1

Los experimentos siguientes muestran cómo los métodos actualmente disponibles en la técnica no identifican Titn como un péptido fuera de diana. Estos métodos no fueron capaces de predecir los efectos secundarios no deseados al administrar células T a3a en los pacientes (manuscrito en preparación).

a) *Búsqueda de similitud*

Se realizó una búsqueda en la base de datos RefSeq para péptidos humanos con una secuencia similar a A3 MAGE utilizando BLAST (por sus siglas en inglés, herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas) para proteínas, versión 2.2.27 (Altschul, et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome). Se ajustaron los parámetros del algoritmo automáticamente para una proteína corta. (Parámetros generales; umbral esperado=200000, tamaño de término=2; Parámetros de puntuación: matriz=PAM30, costes de hueco=existencia 9 extensión 1; sin ajustes composicionales).

La búsqueda de BLAST devolvió más de 100 resultados, incluyendo A3 MAGE, A6 MAGE y B18 MAGE, pero no Titina. Se seleccionaron 15 secuencias para el ensayo utilizando dianas pulsadas con péptido (células hepatocitos HLA-A*01 $^+$) y ensayos ELISpot IFN γ tales como los descritos en el Ejemplo 1 (secciones 1.1a y 1.1b). Las secuencias de los péptidos se detallan en la figura 9. Ninguno de estos péptidos era capaz de activar las células T a3a o las células T redirigidas por IMCmage1.

b) *Cribado de células primarias*

Se cribaron células humanas HLA-A*01 $^+$ procedentes de diversos tejidos para su capacidad de inducir la activación de las células T a3a y las células T redirigidas por IMCmage1. La activación de las células T se evaluó a partir de la liberación de IFN γ utilizando un ensayo ELISpot tal como se describe en el Ejemplo 1 (secciones 1.1a y 1.1b). Se utilizaron múltiples lotes para la mayoría de los tipos de célula primaria. Las células se cultivaron en cultivo 2D.

- Astrocitos
- Miocitos cardíacos
- Células epiteliales ciliares no pigmentadas
- Células de músculo liso bronquial
- Fibroblastos dérmicos
- Células endoteliales microvasculares dérmicas
- Hepatocitos
- Fibroblastos pulmonares
- Células epiteliales renales
- Melanocitos
- Músculo esquelético
- Células endoteliales microvasculares pulmonares

Los resultados no mostraron reactividad evidente con células T transducidas con IMCmage1 y a3a. Debido a que la expresión de las proteínas de la familia de MAGE está restringida a las células de la línea germinal masculina, la reactividad cruzada con A6 MAGE y B18 MAGE no se detecta. Sin embargo, a pesar de que titina se expresa en músculo cardíaco y esquelético, este experimento no consiguió detectar la reactividad cruzada con células esqueléticas y musculares. Debido a que la expresión de Titina es conocido que está regulada positivamente en tejido diferenciado (Van der Loop et al., J. Muscle Res. Cell Motil. 17:23-36, 1996), la detección de la reactividad cruzada requirió cultivos celulares más especializados (tales como las iCells mostradas anteriormente).

C) ¿Un modelo de ratón habría identificado la toxicidad fuera de diana?

La alineación de secuencias de la proteína Titina humana de longitud completa con la proteína Titina de ratón se llevó a cabo utilizando la función align en la base de conocimientos de Uniprot (<http://www.uniprot.org/align>). El péptido Titina de ratón equivalente presenta la secuencia siguiente:

Péptido	Secuencia de péptido								
Titina - ser humano	E	S	D	P	I	V	A	Q	Y
Titina - ratón	E	S	E	P	V	V	A	Q	Y

La activación de las células T a3a se evaluó utilizando células hepatocitos HLA-A*01+ pulsadas con péptido A3 MAGE, Titina humana o Titina de ratón. La activación de las células T se determinó mediante ensayo ELISpot IFN γ tal como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron péptidos sintéticos de Peptide Protein Research Limited, Reino Unido.

La figura 10 muestra la liberación de IFN γ en respuesta a la pulsación de células hepatocitos HLA-A*01+ con A3 MAGE y Titina humana; no se detectó IFN γ al pulsar las células con el péptido Titina equivalente del ratón. Por lo tanto, un modelo de ratón no habría identificado Titina como un péptido fuera de diana que condujese a efectos secundarios no deseados al administrarlo en un paciente.

Ejemplo 2

El péptido diana presentado en CMH utilizado en el presente ejemplo se deriva del antígeno testicular de cáncer humano NY-ESO-1 y presenta la secuencia de aminoácidos siguiente: SLLMWITQC. El péptido NY-ESO-1 se presenta sobre las células presentadoras de antígeno en el contexto de HLA-A*02.

El péptido de unión utilizado en el presente ejemplo comprende una proteína de fusión de receptor de células T (RCT) modificado que ha sido manipulado para poseer una afinidad potenciada para el péptido NY-ESO-1 y se denomina ImmTAC-NYESO en el presente ejemplo. La producción de tales proteínas de fusión se describe en McCormack et al., Cancer Immunol. Immunother. 62(4):773-85, 2013; Liddy et al., Nat. Med. 8:980-987, 2012.

2.1 Identificación del motivo de unión mediante sustitución con alanina

Se obtuvieron variantes del péptido NY-ESO-1 nativo en el que cada posición aminoácido se substituyó secuencialmente por alanina, tal como se muestra posteriormente (en cada caso, la substitución por alanina se encuentra subrayada). Los péptidos se obtuvieron de Peptide Protein Research Limited, Reino Unido.

- A L L M W I T Q C
- S A L M W I T Q C
- S L A M W I T Q C
- S L L A W I T Q C
- S L L M A I T Q C
- S L L M W A T Q C
- S L L M W I A Q C
- S L L M W I T A C
- S L L M W I T Q A

Los péptidos nativos y con substitución de alaninas se agregaron a células presentadoras de antígenos y se utilizó la producción de interferón γ (IFN γ), medida utilizando el ensayo ELISpot, como lectura de la activación de las células T. Se definieron las posiciones esenciales por una reducción superior a 50% de la actividad de las células T en comparación con el péptido nativo.

Se llevaron a cabo ensayos ELISpot tal como se indica en el Ejemplo 1, sección 1.1b, excepto en que se utilizaron células T2 HLA-A2+ como células dianas y las CMSP efectoras se sembraron a razón de 40.000 células por pocillo. Se añadió ImmTAC-NYESO a una concentración final de 0,1 nM por pocillo.

La figura 11 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por ImmTAC-NYESO en respuesta a péptido NY-ESO-1 nativo (wt) y cada péptido con substitución de alaninas. Cinco de los péptidos con substitución de alaninas resultaron en una reducción superior al 50% de la producción de IFN γ en comparación con el péptido NY-ESO-1 nativo. El residuo nativo correspondiente en cada una de estas cinco posiciones comprendía el motivo de unión. En este caso, el motivo de unión se define como XLXMWITQX, donde X es cualquier aminoácido.

2.2 Identificación de péptidos fuera de diana potenciales

5 Se utilizó la herramienta ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>) para las búsquedas en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (fecha de versión: 13 de nov., 2013) para proteínas que contenían el motivo identificado anteriormente (introducido como X L X M W I T Q X). La búsqueda se limitó a secuencias humanas.

10 Se identificaron dos proteínas humanas únicas: NY-ESO-1 (nº de acceso P78358) y LAGE-1A (nº de acceso O75638-2), un antígeno testicular de cáncer alternativo que posee la misma secuencia de 9 aminoácidos que el péptido NY-ESO-1. Los RCT que se unen al péptido NY-ESO-1 es conocido que reconocen las células de cáncer que expresan LAGE-A1 (McCormack et al., Cancer Immunol. Immunother. 62(4):773-85, 2013).

2.3 Identificación del motivo de unión por sustitución con todos los aminoácidos alternativos

15 Se obtuvieron variantes del péptido NY-ESO nativo en el que el residuo aminoácido en cada posición se sustituyó secuencialmente con la totalidad de los 19 aminoácidos naturales alternativos, de manera que se preparó un total de 171 péptidos. Los péptidos nativos y con sustitución de alaninas se agregaron a células presentadoras de antígenos y se utilizó la producción de interferón γ (IFN γ), medida utilizando el ensayo ELISpot, como lectura de la activación de las células T. Se definieron las posiciones esenciales por una reducción superior a 50% de la actividad de las células T en comparación con el péptido nativo.

Se llevaron a cabo ensayos ELISpot tal como se describe en la sección 2.1a.

25 La figura 12 muestra la producción de IFN γ por células T redirigidas por ImmTAC-NYESO en respuesta a péptido NY-ESO-1 nativo (wt) y cada péptido con sustitución de aminoácido.

Los residuos tolerados en cada posición del péptido se muestran posteriormente. Para cada posición, el primer residuo tolerado que se muestra corresponde al residuo nativo (WT) en esa posición.

Posición	Residuos tolerados
1	S V T Y M F A G H N Q K P R W L I
2	L I
3	L V A M I C Q N H
4	M Q V T N
5	W
6	I T L M S
7	T S D
8	Q G
9	C L V M S T G A I

30

2.4 Identificación de péptidos fuera de diana potenciales

35 Se utilizó la herramienta ScanProsite tal como se describe en la sección 2.2 para buscar las proteínas que contenían los residuos tolerados en las posiciones indicadas (introducidos como [SVTYMFAGHNQKPRWLI]-[LI]-[LVAMICQNH]-[MQVTN]-W-[ITLMS]-[TSD]-[QG]-[CLVMSTGAI])

Se encontraron dos proteínas únicas (excluyendo NY-ESO y LAGE A1).

Proteína (número de acceso)	Secuencia de péptido	Posición
Plexina-D1 (Q9Y4D7)	HLCMWSDGC	867 - 875:
proteína 5B1 que contiene dominio factor A de von Willebrand (Q5TIE3)	GLLNWITGA	3-11

40 Los péptidos plexina-D1 y 5B1 se sometieron a ensayo *in vitro* tal como se describe en el Ejemplo 1.3 a fin de confirmar el reconocimiento por ImmTAC-NYESO. El potencial de estos péptidos fuera de diana de causar efectos secundarios no deseados *in vivo* se determinó mediante, por ejemplo, la referencia a fuentes de la literatura que detallan la expresión de plexina-D1 y proteína 5B1 en tejido normal. En donde la expresión en tejido normal es generalizada, o en tejidos críticos, la unión de ImmTAC-NYESO puede confirmarse adicionalmente *in vitro* utilizando células que expresan el péptido fuera de diana.

45

Ejemplo comparativo 2

a) Búsqueda de similitud

50

Se llevó a cabo una búsqueda de similitud en la secuencia WT del péptido NY-ESO-1 utilizando la herramienta BLAST

tal como se describe en el Ejemplo comparativo 1a. Los 100 resultados superiores no devolvieron ninguno de los dos péptidos que contenían motivo identificados anteriormente.

b) Comparación con péptidos de proteínas homólogas en el ratón

La alineación de secuencias de las proteínas plexina D1 y 5B1 humanas de longitud humana con la proteína homóloga de ratón (nº de acceso NP_080652.2 yNP_083677.1, respectivamente) se llevó a cabo utilizando la función align en la base de conocimiento de Uniprot (<http://www.uniprot.org/align>). La comparación de las secuencias peptídicas respectivas se muestra a continuación:

Péptido	Secuencia de péptido								
Plexina D1 - humana	H	L	C	M	W	S	D	G	C
Plexina D1 - de ratón	H	L	C	M	W	N	D	G	C

Péptido	Secuencia de péptido								
Proteína 5B1-humana	G	L	L	N	W	I	T	G	A
Proteína 5B1-de ratón	G	L	L	N	C	L	T	G	A

Ninguno de los péptidos de ratón contenía el motivo identificado en la sección 2.3; por lo tanto, un modelo de ratón podría no identificar la reactividad cruzada potencial.

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir si un péptido de unión que se une a un péptido diana presentado por un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y está destinado a la administración en un sujeto, presenta el potencial de reaccionar cruzadamente con otro péptido en el sujeto *in vivo*, comprendiendo el método:

5 identificar por lo menos un motivo de unión en el péptido diana al que se une el péptido de unión, buscar los péptidos presentes en el sujeto que comprenden por lo menos un motivo de unión y que no son el péptido diana, y

10 someter a ensayo la unión de cualquiera de tales péptidos al péptido de unión *in vitro*, en el que la presencia de uno o más de tales péptidos que se unen al péptido de unión indica que el péptido de unión presenta el potencial de reaccionar cruzadamente *in vivo*, identificando el motivo o motivos de unión mediante:

15 (i) la creación de una serie de mutantes del péptido diana, presentando cada mutante el residuo aminoácido en una posición en la secuencia de unión del mismo que participa en la unión al péptido de unión sustituido por alanina o glicina, de manera que, en la serie de mutantes, el residuo aminoácido en cada posición en la secuencia de unión se sustituye por alanina o glicina, y el ensayo de cada mutante en la serie para su actividad respecto al péptido diana de tipo salvaje,

20 en el que se identifica un residuo aminoácido en una posición dentro de la secuencia de unión como parte del motivo de unión si el mutante en que el aminoácido en esa posición se ha mutado a alanina o glicina presenta una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje, o

25 (ii) la creación de una serie de mutantes, presentando cada mutante el residuo aminoácido en una posición en la secuencia de unión sustituida por un aminoácido alternativo, de manera que en la serie de mutantes, el residuo aminoácido en cada posición en la secuencia de unión se sustituye por todos los aminoácidos alternativos, y el ensayo de cada mutante en la serie para su actividad respecto al péptido de tipo salvaje, en el que las sustituciones de aminoácidos que resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se considera que son aminoácidos no tolerados y no parte del motivo de unión y/o sustituciones de aminoácidos que no resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se consideran parte del motivo de unión.
2. Método según la reivindicación 1(i), que comprende, además, donde un residuo aminoácido en una posición en la secuencia de unión no se identifica como parte del motivo de unión, la sustitución de esta posición por como mínimo un aminoácido adicional y el ensayo de la actividad respecto al péptido de tipo salvaje, en el que las sustituciones de aminoácidos que resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se considera que son aminoácidos no tolerados y no parte del motivo de unión y/o las sustituciones de aminoácidos que no resultan en una pérdida de actividad de 50% o superior respecto al péptido diana de tipo salvaje se consideran como parte del motivo de unión.
3. Método según cualquiera reivindicación anterior, en el que la actividad que se somete a ensayo es la capacidad del mutante de unirse al péptido de unión.
4. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el sujeto es un ser humano y la búsqueda se lleva a cabo para péptidos que son de origen humano o de organismos que se encuentran presentes comúnmente en el ser humano.
5. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la búsqueda se lleva a cabo para péptidos que se expresan en uno o más tejidos seleccionados y/o accesibles al péptido de unión.
6. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el péptido de unión es un péptido de unión inmunológico.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el péptido de unión inmunológico es un receptor de célula T o un anticuerpo.

Figura 1

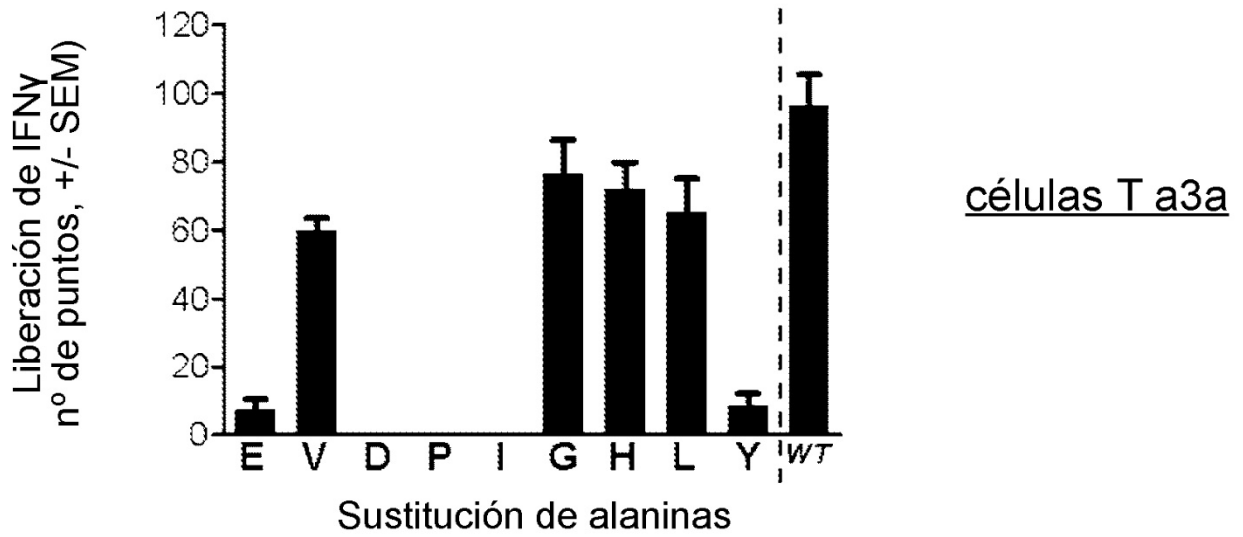


Figura 2

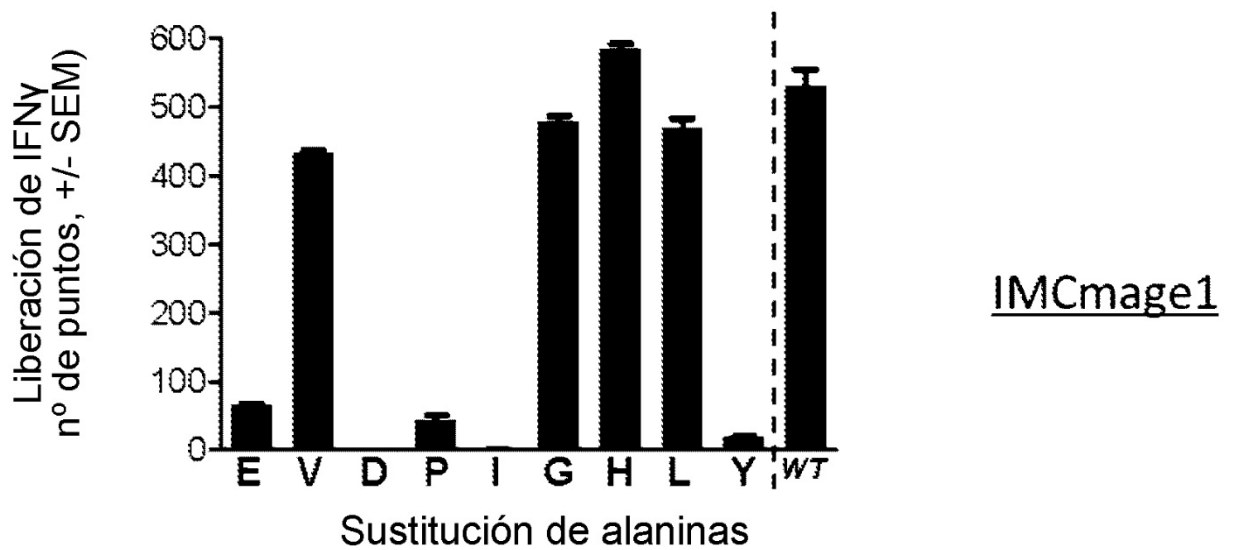


Figura 3

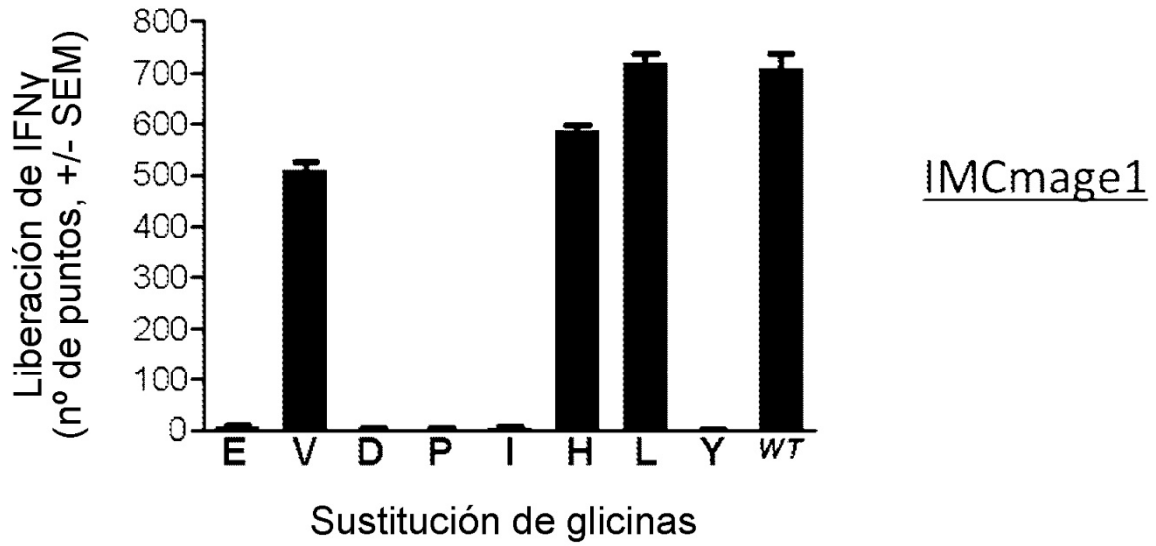


Figura 4

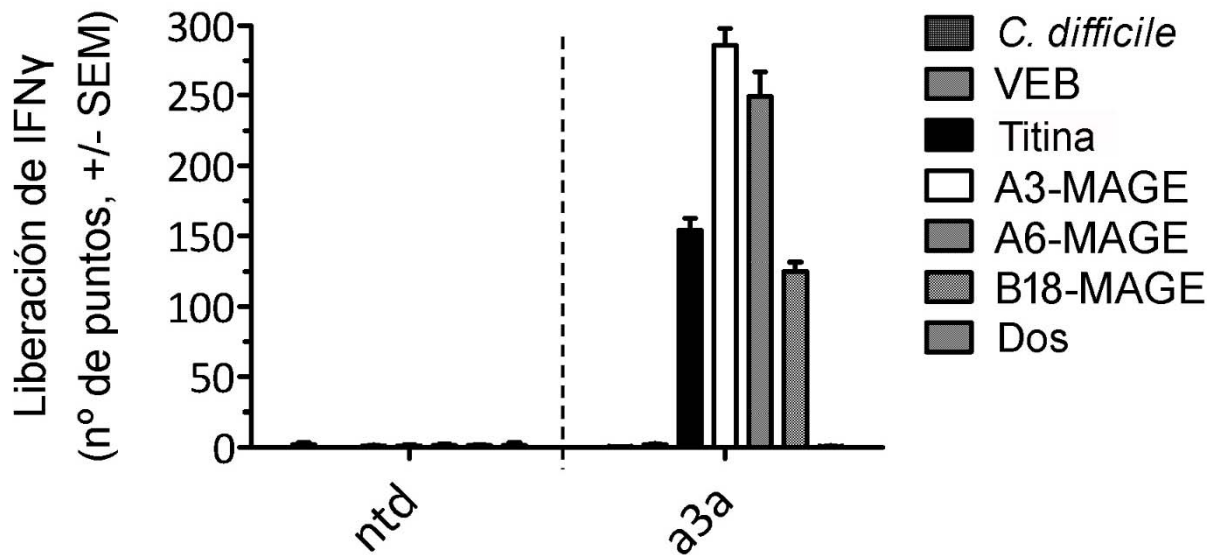


Figura 5

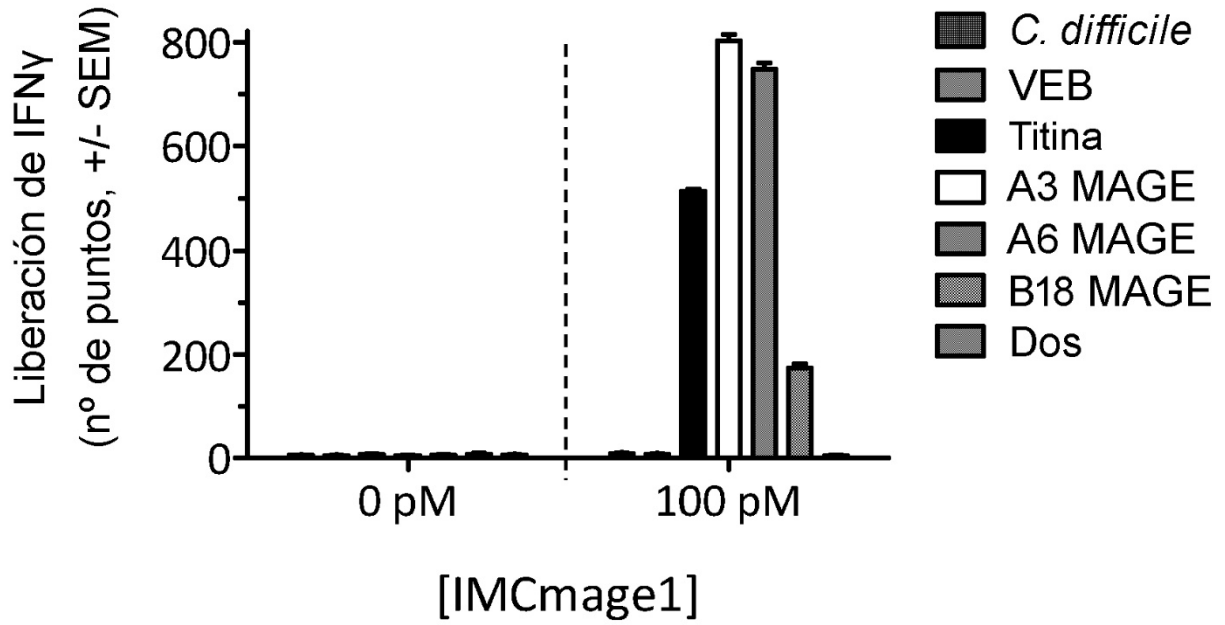


Figura 6

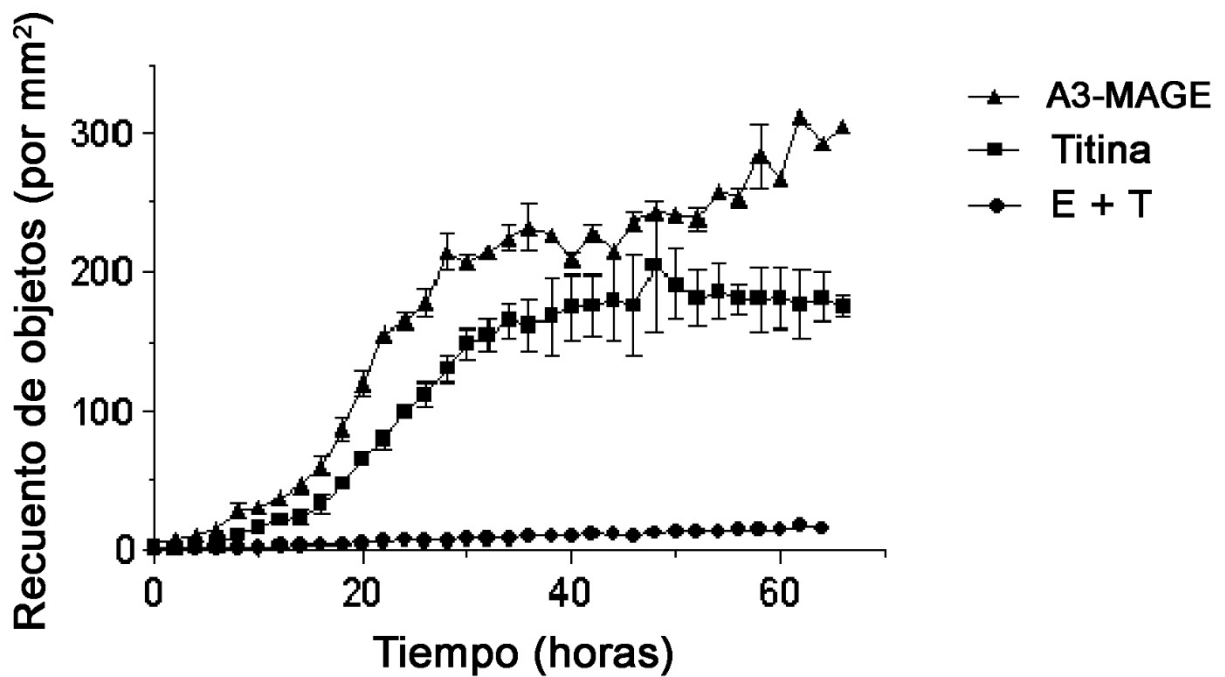


Figura 7

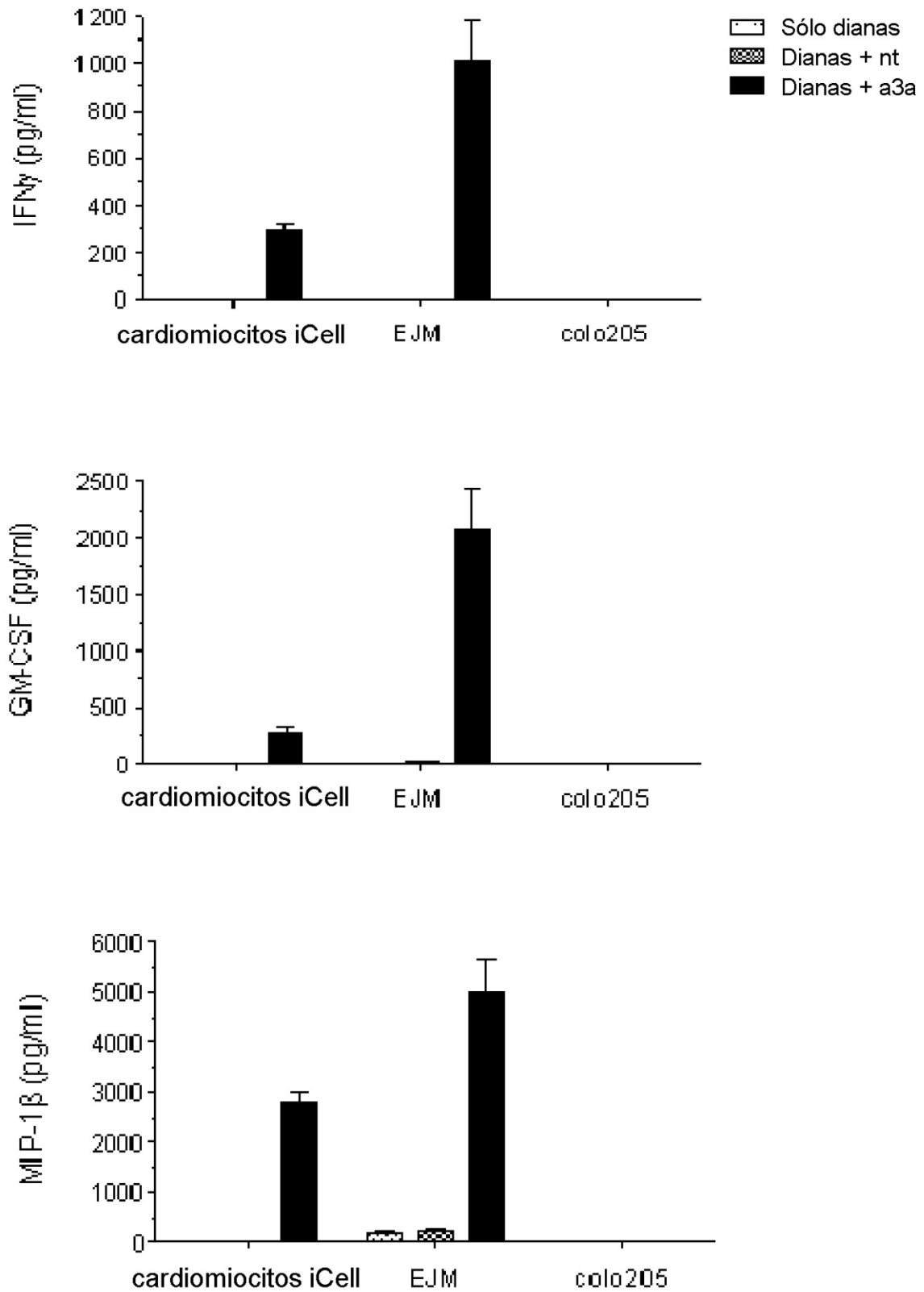
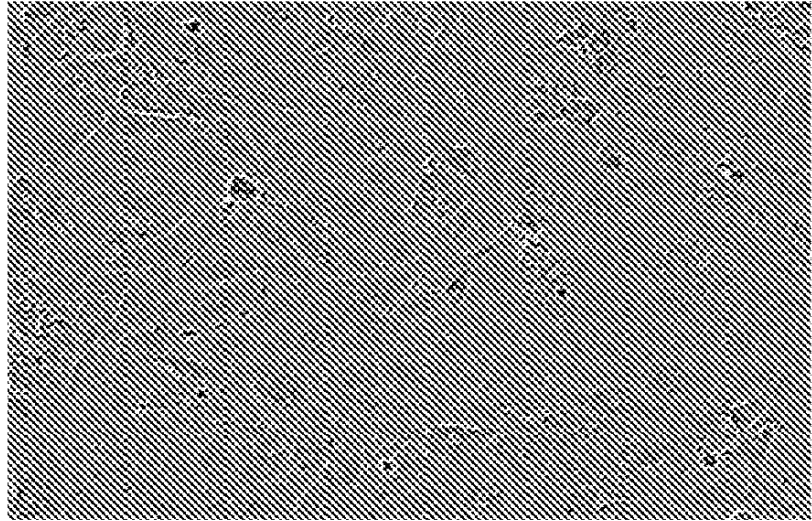
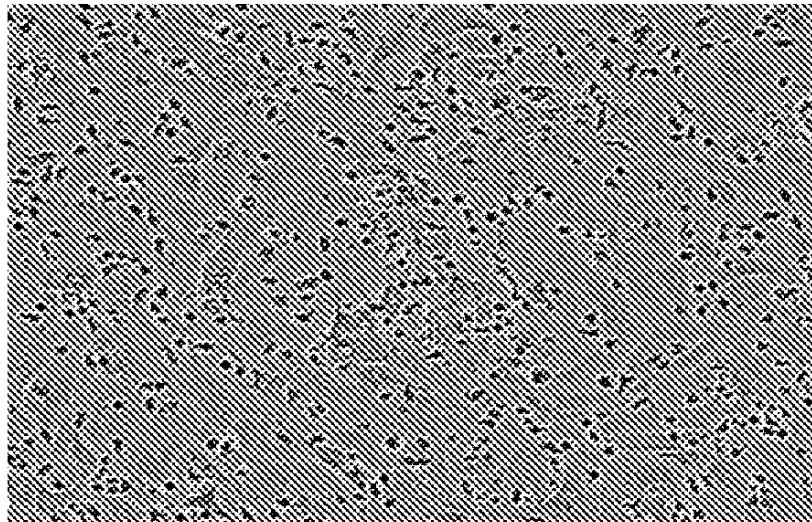


Figura 8

sólo iCells



células T +ntd



células T +a3a

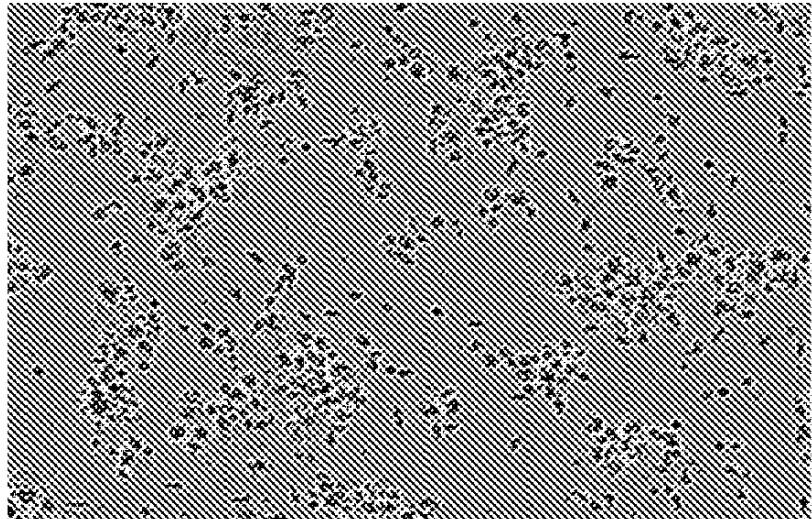


Figura 9

Antígeno	Secuencia									Expresión tisular normal	actividad de células T (a3a / IMCmage1)
MAGE-A3	E	V	D	P	I	G	H	L	Y	Testículo	P
MAGE-A6	E	V	D	P	I	G	H	V	Y	Testículo	P
MAGE-B18	E	V	D	P	I	R	H	Y	Y	Testículo	P baja
Caveolina-1	Y	V	D	S	E	G	H	L	Y	Ubicua	x
FGD5	E	V	G	P	I	F	H	L	Y	Sobreexpresión en corazón	x
ERRFI1	N	I	D	P	I	T	M	A	Y	Diversa (sobreexpresión en aorta)	x
RFWD2	V	V	D	N	I	D	H	L	Y	Diversa	x
DMXL2	R	V	D	P	I	G	P	L	S	Diversa	x
ATF4	T	V	N	P	I	G	H	L	P	Infraexpresión en corazón	x
PZP	P	K	A	P	V	G	H	L	Y	Diversa (sobreexpresión en corazón)	x
LMX1A	V	G	N	P	I	D	H	L	Y	Diversa	x
AOX1	P	E	D	P	I	G	H	P	I	Diversa	x
ARAP3	L	A	T	L	I	G	H	L	Y	Diversa (sobreexpresión en corazón)	x
MARS2	A	A	P	H	I	G	H	L	Y	Limitada (cerebro, páncreas)	x
SYNGAP1	E	V	D	P	I	K	C	T	A	Diversa	x
TNRC6B	S	P	D	P	I	G	H	N	P	Diversa (sobreexpresión en corazón)	x
COEA1	E	V	D	P	I	T	T	F	P	Diversa	x
BRD4	V	F	D	P	I	G	H	F	T	Diversa	x

Figura 10

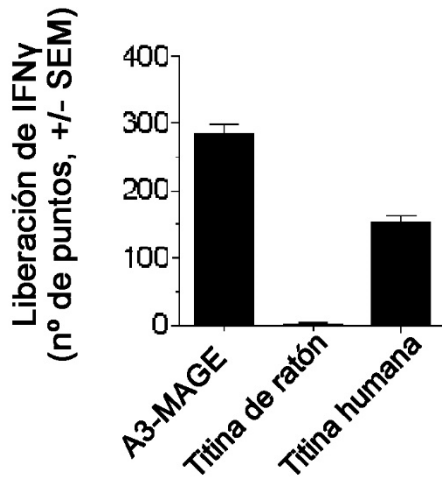


Figura 11

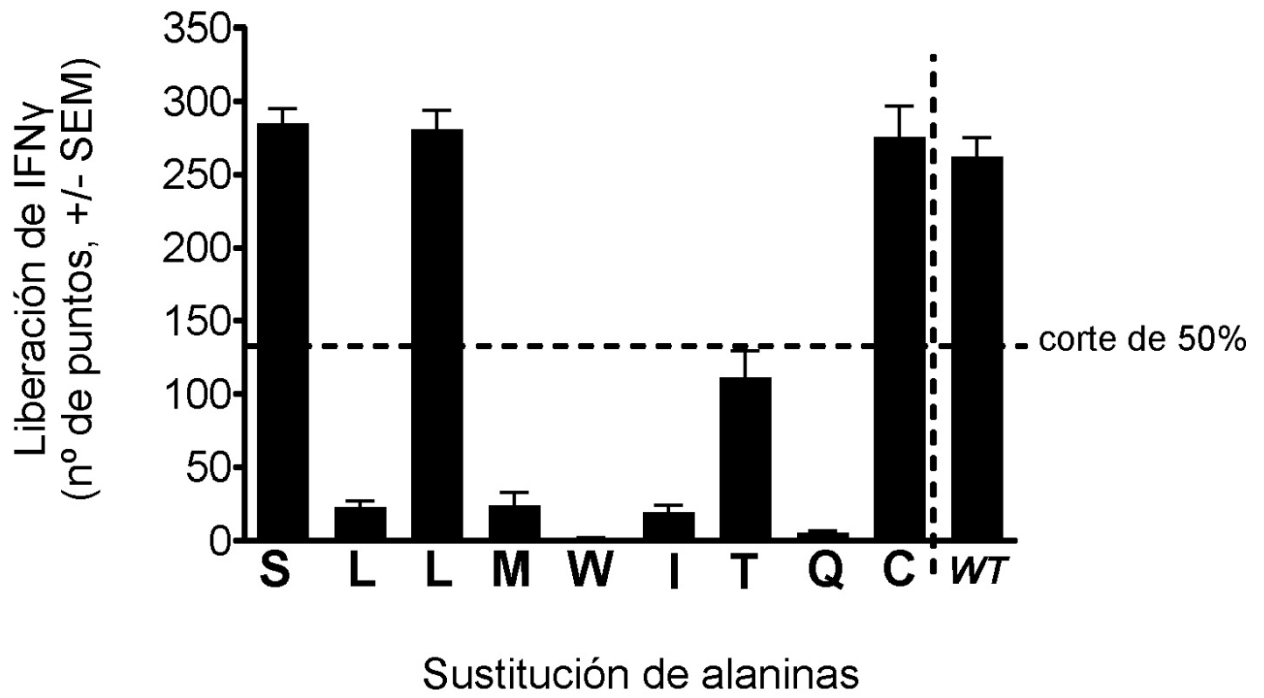


Figura 12

