



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 463**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99959535 .8**
86 Fecha de presentación : **08.12.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1051432**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2000**

54 Título: **Método para reducir la inmunogenicidad de proteínas.**

30 Prioridad: **08.12.1998 GB 9826925**
02.02.1999 GB 9902139

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

73 Titular/es: **Biovation Limited**
Investment House, 6 Union Row
Aberdeen AB10 1DQ, GB

72 Inventor/es: **Carr, Francis Joseph;**
Adair, Fiona Suzanne;
Hamilton, Anita Anne y
Carter, Graham

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 278 463 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 reducir la inmunogenicidad de proteínas.

5 La presente invención se refiere a proteínas que han de administrarse especialmente a seres humanos, particularmente para uso terapéutico pero también para uso en pruebas diagnósticas. La invención proporciona particularmente proteínas que se modifican para que sean menos inmunogénicas que el homólogo no modificado cuando se usan *in vivo*.

10 La invención se dirige particularmente a la necesidad clínica de un proceso por el que la tendencia natural del huésped a montar una respuesta inmune contra una proteína administrada se reduzca substancialmente o se elimine. Existen varios ejemplos en los que la administración de moléculas proteínicas ofrece un beneficio terapéutico. Sin embargo, el beneficio se reduce mucho, particularmente, cuando se requieren múltiples dosis de la proteína terapéutica a medida que el sistema inmunitario del receptor reconoce y acelera la eliminación de la proteína terapéutica entrante.

15 Existe un número de proteínas terapéuticas cuyo uso terapéutico está restringido debido a su inmunogenicidad en el hombre. Por ejemplo, cuando anticuerpos murinos se administran a pacientes que no están inmunosuprimidos, una mayoría de los pacientes monta una reacción inmunitaria hacia el material extraño elaborando anticuerpos anti-murino humanos (HAMA). Existen dos consecuencias graves. En primer lugar, el anticuerpo anti-murino del paciente puede unirse a y depurar el anticuerpo terapéutico o inmovilizarse antes de que tenga una posibilidad de unirse al tumor y realizar su función. En segundo lugar, el paciente puede desarrollar una sensibilidad alérgica al anticuerpo murino y estar en riesgo de choque anafiláctico durante cualquier exposición futura a inmunoglobulina murina.

25 Se han desarrollado varias técnicas para hacer frente al problema de los HAMA y así permitir el uso en seres humanos de anticuerpos monoclonales terapéuticos (véanse, por ejemplo, WO-A-8909622, EP-A-0239400, EP-A-0438310, WO-A-9109967). Un aspecto común de estas metodologías ha sido la introducción en el anticuerpo terapéutico, que en general es de origen de roedor, de rasgos significativos de secuencia idéntica a la presente en proteínas de anticuerpos humanos. Tales alteraciones también están habitualmente acopladas a la alteración de residuos de aminoácido simples particulares en posiciones consideradas críticas para mantener la interacción de unión anticuerpo-antígeno. Para los anticuerpos, este proceso es posible debido al grado muy alto de conservación estructural (y funcional) entre moléculas de anticuerpo de diferentes especies. Sin embargo, para proteínas potencialmente terapéuticas en las que no puede existir un homólogo estructural en la especie huésped (por ejemplo, ser humano) para la proteína terapéutica, tales procesos no son aplicables. Por otra parte, estos métodos han supuesto que la introducción general de una secuencia humana hará al anticuerpo remodelado no inmunogénico. Sin embargo, se sabe que ciertas secuencias peptídicas cortas ("epítopos de células T") pueden liberarse durante la degradación de proteínas dentro de las células y subsiguientemente ser presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para potenciar la activación de células T. Para péptidos presentados por el MHC clase II, tal activación de células T puede entonces dar lugar a una respuesta de anticuerpos mediante la estimulación directa de células B para producir tales anticuerpos. Ninguno de los métodos previos se ha dirigido a la eliminación o evitación de tales epítopos en la molécula terapéutica final como un medio para reducir o eliminar la respuesta de anticuerpos contra proteínas. Ni los métodos previos han considerado la eliminación de péptidos presentados por MHC clase I que pueden potenciar una respuesta de células T citotóxica que conduce a la muerte celular. Tal muerte de células provoca la liberación de componentes celulares incluyendo proteínas que pueden, a su vez, activar células especializadas que son altamente activas en el procesamiento de proteínas y la presentación por el MHC y también en la liberación de citoquinas inflamatorias como resultado de tal activación. Como resultado, puede crearse un entorno inflamatorio que promueve la captación y el procesamiento más activos de la proteína para uso terapéutico, facilitando así la introducción de una respuesta de anticuerpos contra la proteína.

35 40 45 50 WO 98/52975 muestra la retirada de epítopos de células T de proteínas, preferiblemente anticuerpos terapéuticos, que son heterólogas para un organismo huésped específico, tal como un ser humano.

WO 92/10755 trata de un método para el mapeado de epítopos de células B usando métodos inmunológicos y proteoquímicos, y de epítopos correspondientes que se cambian mediante mutación.

55 EP 0 721 982 proporciona variantes de estafiloquinasa, una proteína bacteriana, que se modificaban con respecto a epítopos de células B existentes.

EP 0699755 se dirige a un método para modificar dominios regionales de inmunoglobulina V de un anticuerpo heterólogo usando diferentes técnicas de humanización.

60 Fedoseyeva y otros (J. Exp. Med. 182, 1995, 1481-1491) presentaron que ciertos autopéptidos procesados a partir de proteínas autólogas mediante presentación a células T autorreactivas eran inmunogénicos en animales singenéticos. Tiarks y otros (Scand. J. Immunol., 36, 1992, 653-660) muestran la necesidad de modificar epítopos de células T con Factor VIII sin alterar significativamente su función biológica.

65 Otro documento científico (Nolte y otros, 1996, Eur. J. Immunol., 26, 2155-2159) presentaba que los pacientes que reciben interferón alfa 2 (IFN2) pueden desarrollar anticuerpos anti-IFN2, que reconocen epítopos de células B que tienen que identificarse y eliminarse.

ES 2 278 463 T3

Se ha descrito previamente la eliminación de epítomos de células T de proteínas (véase WO-A-9852976) por la que tales epítomos de células T potenciales se definen como cualquier péptido dentro de la secuencia proteínica con la capacidad para unirse a moléculas del MHC clase II. Tales epítomos potenciales se miden mediante cualquier método computacional o físico para establecer la unión al MHC. Implícito en el término “epítomo de células T” está un epítomo que es reconocido por el receptor de células T y que puede al menos en principio provocar la activación de estas células T. Sin embargo, habitualmente, se entiende que ciertos péptidos que se encuentran que se unen a moléculas del MHC clase II pueden retenerse en una secuencia proteínica debido a que tales péptidos son reconocidos como “propios” dentro del organismo al que se administra la proteína final.

En la práctica, proteínas solubles introducidas en organismos autólogos a veces sí potencian una respuesta inmunitaria dando como resultado el desarrollo de anticuerpos del huésped que se unen a la proteína soluble. Un ejemplo es el interferón alfa 2 para el que un porcentaje de pacientes humanos elabora anticuerpos a pesar del hecho de que esta proteína es producida endógenamente.

La presente invención se basa en el descubrimiento por parte de los inventores de que los péptidos que se unen al MHC dentro de proteínas autólogas, tales como interferón alfa 2, pueden potenciar respuestas inmunitarias en organismos vivos para esos pacientes incluso cuando la proteína específica es producida endógenamente. Una posible explicación de esto es que las dosis de tales proteínas administradas son muy superiores a las normales, proporcionando formación de MHC-péptido que puede activar células T. Alternativamente, el entorno fisiológico al que se presentan tales proteínas administradas es uno favorable al procesamiento de antígenos y la formación de péptido-MHC eficaces en niveles superiores que los encontrados habitualmente, por ejemplo en situaciones inflamatorias.

De acuerdo con un aspecto específico de la invención, se proporciona un método para hacer al interferón alfa 2 (IFN2) humano no inmunogénico o menos inmunogénico para un ser humano, comprendiendo el método:

- (a) determinar al menos parte de la secuencia de aminoácidos de IFN2 humano maduro;
- (b) identificar epítomos de células T potenciales analizando dicha secuencia con respecto a la presencia de motivos que se unen al MHC clase II humano, y
- (c) eliminar de dicha secuencia de aminoácidos al menos uno de dichos epítomos de células T identificados de acuerdo con la etapa b), reduciendo de ese modo la inmunogenicidad de IFN2 cuando se expone al sistema inmunitario de un ser humano.

En la etapa (c), pueden eliminarse uno o más epítomos reales o epítomos potenciales.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método modificado para crear IFN2 humano que potencia una respuesta inmunitaria reducida o ausente por el que uno o más péptidos que se unen al MHC que también se encuentran en la proteína endógena del organismo autólogo se modifican para reducir o eliminar la unión a moléculas del MHC. Así, en la práctica, no se hace una suposición acerca de qué péptidos podrían ser tolerados por el organismo (a no ser que estén disponibles datos que indiquen que hay tolerancia presente). En general, la invención abarca la creación de moléculas proteínicas de IFN2 con inmunogenicidad reducida o ausente en organismos vivos donde uno o más péptidos que se unen a moléculas del MHC clase II se eliminan de la molécula proteínica.

El aspecto de la invención descrito anteriormente se prefiere a la estrategia alternativa de inmunizar separadamente el organismo con tales péptidos para inducir tolerancia o la alternativa de administrar análogos o fragmentos de la proteína que resisten la unión a o la captación en células (especialmente células que presentan antígeno), por ejemplo mediante eliminación del sitio de unión a células de la proteína. Hacer de ese modo tolerante el organismo al péptido (por ejemplo, el uso de péptidos que se unen al MHC identificados a partir de una proteína singeneica que puede usarse para inducir tolerancia en el huésped antes de la administración de toda la proteína) requerirá dos moléculas terapéuticas, una para realizar la función principal de la proteína y la otra para inducir la tolerancia, lo que no estaría favorecido desde el punto de vista regulador.

Puede usarse en la invención cualquier método para identificar -en cuyo término se incluye predecir- uno o más epítomos de células T potenciales. Métodos aceptables pueden ser computacionales o físicos e incluyen la medida de la unión de complejos MHC-péptido a receptores de células T, la prueba de epítomos de células T potenciales en ratones transgénicos que expresan moléculas del MHC humanas, la prueba de epítomos de células T potenciales en ratones reconstituidos con células que presentan antígeno humano y células T en lugar de sus células endógenas, y la prueba de epítomos de células T potenciales para la estimulación de células T *in vitro* a través de la presentación de péptidos sobre moléculas del MHC usando células que presentan antígeno singeneicas.

Así como identificar en la secuencia de aminoácidos uno o más epítomos de células T potenciales que se encuentran en IFN2 humano, un método de la invención puede implicar, y típicamente implicará, identificar y eliminar adicionalmente uno o más epítomos de células T potenciales que no se encuentran en un IFN2 humano endógeno de un ser humano, ya que tales epítomos son incluso más propensos a ser inmunogénicos.

La presente invención se basa en un nuevo concepto en el desarrollo de proteínas terapéuticas. Se ha identificado previamente que, con proteínas dependientes de células T exógenas, los epítomos de células T cooperadoras son im-

portantes para el desarrollo de una respuesta inmunitaria significativa a la proteína autóloga. Tales epítomos de células T funcionan a través del procesamiento interno de la proteína liberando péptidos que se complejan con moléculas del MHC clase II y que a continuación se presentan sobre la superficie de células apropiadas para la unión potencial a receptores sobre células T. Sin embargo, es muy difícil predecir qué péptidos dentro de la proteína se procesarán apropiadamente de modo que pueda producirse la unión al MHC y también es un factor que muchos péptidos procesados no se unirán a todas las variantes alótípicas de moléculas del MHC clase II (restricción del MHC). Por otra parte, en cualquier organismo vivo dado, es difícil predecir si una respuesta de células T será realmente potenciada por un péptido dado presentado sobre el MHC clase II debido a que las células T pueden haberse hecho tolerantes a tales epítomos o pueden no tener el repertorio de receptores de células T para unirse al complejo MHC clase II-péptido. Debido a estos factores complicados, previamente no ha sido práctico desarrollar proteínas con inmunogenicidad reducida o ausente debido a la dificultad para predecir epítomos de células T reales. La presente invención considera principalmente el nuevo sistema para crear proteínas terapéuticas mejoradas, tales como IFN2 humano, mediante la retirada de epítomos de células T potenciales en vez de reales (habitualmente definidos por la unión a moléculas del MHC), de modo que ciertos péptidos dentro de la molécula que no son realmente inmunogénicos pueden alterarse además de los péptidos inmunogénicos. Para un IFN2 terapéutico, preferiblemente todos los epítomos de células T potenciales se retiran mientras que se retiene la actividad de la proteína. Preferiblemente, esto implica la elección juiciosa de la sustitución de aminoácidos que permite la retirada de los epítomos de células T y habitualmente implicará la prueba de una gama de moléculas variantes con diferentes sustituciones de aminoácidos.

No todos los epítomos de células T potenciales identificados que se encuentran en IFN2 humano necesitan eliminarse. Por ejemplo, en general, no se montan respuestas inmunitarias a proteínas circulantes autólogas, tales como inmunoglobulinas y otras proteínas séricas tales como albúmina sérica. Así, epítomos de células T potenciales que se encuentran, por ejemplo, en secuencias proteínicas de regiones variables de inmunoglobulina de la línea germinal de la especie dada (que generalmente será el ser humano) pueden a veces ignorarse. Sin embargo, un epítomo que se considera que generalmente no está disponible para el sistema inmunitario para ganar tolerancia puede identificarse como un epítomo potencial para la eliminación de acuerdo con el método de la presente invención.

La invención proporciona por lo tanto proteínas de IFN2 humano que se han alterado para reducir su inmunogenicidad así como un método general para alterar dicha proteína para reducir su inmunogenicidad. Un principio fundamental de la presente invención es que las proteínas se alteran mediante identificación de epítomos de células T potenciales y su alteración subsiguiente dentro de las proteínas para eliminar tales epítomos potenciales.

Después de la eliminación de uno o más epítomos de células T, la proteína puede probarse con respecto a la actividad deseada. Puede retener su actividad completa o puede retener una proporción suficiente de su actividad original para que sea útil. En algunas circunstancias, la actividad puede alterarse bien beneficiosamente o bien al menos de un modo aceptable. Las proteínas que carecen totalmente de una función útil después de la modificación pueden descartarse.

Un protocolo típico dentro del método general de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- I. Determinar la secuencia de aminoácidos de IFN2 humano o una parte de la misma (si solo se requiere la modificación de una parte);
- II. Identificar epítomos de células T potenciales dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante cualquier método, incluyendo la determinación de la unión de péptidos a moléculas del MHC, la determinación de la unión de complejos péptido:MHC a los receptores de células T de la especie que ha de recibir la proteína terapéutica, la prueba de la proteína o partes peptídicas de la misma usando animales transgénicos con las moléculas del MHC de la especie que ha de recibir la proteína terapéutica, o la prueba con animales transgénicos reconstituidos con células del sistema inmunitario de la especie que ha de recibir la proteína terapéutica;
- III. Mediante ingeniería genética u otros métodos para producir proteínas modificadas, alterar la proteína del IFN2 para retirar uno o más de los epítomos de células T potenciales y producir tal proteína alterada para la prueba;
- IV. (opcionalmente) Dentro de la etapa III., alterar la proteína del IFN2 para retirar uno o más de los epítomos de células B potenciales;
- V. Probar proteínas alteradas con uno o más epítomos de células T (y opcionalmente epítomos de células B) potenciales retirados para identificar una proteína de IFN2 modificada que ha retenido la totalidad o parte de su actividad deseada pero que ha perdido uno o más epítomos de células T.

Epítomos de células T potenciales se definen aquí como secuencias peptídicas específicas que bien se une con una eficacia razonable a moléculas del MHC clase II (o su equivalente en una especie no humana) o bien que en la forma de complejos péptido:MHC se unen fuertemente a los receptores de células T de la especie que ha de recibir la proteína terapéutica o bien que, a partir de estudios previos u otros, muestran la actividad para estimular células T a través de la presentación sobre MHC clase II. El método de la presente invención identifica que una respuesta inmunitaria dependiente de células T eficaz a una proteína extraña requiere la activación del armamento celular del sistema inmunitario. Tal respuesta requiere la captación de la proteína terapéutica (extraña) por células que presentan antígeno (APCs). Una

vez dentro de tales células, la proteína se procesa y fragmentos de la proteína forman un complejo con moléculas del MHC clase II y se presentan en la superficie celular. Si tal complejo va a reconocerse mediante la unión del receptor de células T a partir de células T, tales células pueden, bajo ciertas condiciones, activarse para producir citoquinas estimulantes. Las citoquinas provocarán la diferenciación de células B hasta células productoras de anticuerpo completas. Además, tales respuestas de células T también pueden mediar en otros efectos perjudiciales para el paciente, tales como inflamación y posible reacción alérgica.

Se entiende que no todas las secuencias peptídicas se aportarán al compartimento celular del MHC clase II correcto para la unión al MHC clase II o se liberarán adecuadamente de una proteína celular mayor para la unión subsiguiente al MHC clase II. Se entiende además ni siquiera tales péptidos que son presentados por el MHC clase II sobre la superficie de APCs pueden producir una respuesta de células T por razones que incluyen una falta de la especificidad para células T apropiada, tolerancia por el sistema inmunitario para la secuencia peptídica particular o la baja afinidad del complejo MHC-péptido para el receptor de células T.

La presente invención proporciona la retirada de epítomos de células T potenciales humanos de proteína de IFN2 humano terapéutica, con lo que la secuencia primaria de la proteína terapéutica puede analizarse con respecto a la presencia de motivos que se unen al MHC clase II mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, puede hacerse una comparación con bases de datos de motivos que se unen al MHC, tal como buscando las bases de datos de "motivos" en el sitio <http://wehih.wehi.edu.au/mhcpep/> (primeramente wehil.wehi.edu.au o wchi.wehi.edu.au). Alternativamente, los péptidos que se unen al MHC clase II pueden identificarse usando métodos de enhebrado computacional tales como los descritos por Altuvia y otros (*J. Mol. Biol.* **249** 244-250 (1995)). Pueden usarse métodos similares para identificar y retirar epítomos que se unen a MHC clase I.

Habiendo identificado epítomos de células T de una especie dada (por ejemplo, ser humano) potenciales, estos epítomos se eliminan a continuación mediante la alteración de uno o más aminoácidos, según se requiera para eliminar el epítomo de células T. Habitualmente, esto implicará la alteración de uno o más aminoácidos dentro del propio epítomo de células T. Esto podría implicar alterar un aminoácido adyacente al epítomo en términos de la estructura primaria de la proteína o uno que no sea adyacente en la estructura primaria pero sea adyacente en la estructura secundaria de la molécula. La alteración habitual contemplada será la sustitución de aminoácidos, pero en ciertas circunstancias será apropiada la delección o adición de aminoácidos. En algunos casos, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos para evitar la segmentación proteolítica de una proteína y de ese modo inhibir la unión de un péptido al MHC clase II. Ejemplos de sitios de segmentación de proteasas incluyen los presentados por van Noort y van der Drift (*J. Biol. Chem.* **264** 14159-14164 (1989)) y van Noort y otros (*Eur. J. Immunol.* **21** 1989-1996 (1991)). Se han identificado ejemplos de aminoácidos que evitan la digestión con proteasas, por ejemplo, Kropshofer y otros, *J. Immunol.* **151** 4732-4742 (1993).

En el método de la presente invención, habitualmente un número de variantes de proteínas de IFN2 alteradas se producirá y probará con respecto a la retención de la actividad deseada. Cuando es deseable maximizar la retirada de epítomos de células T potenciales de la proteína, será común crear una gama de variantes incluyendo algunas con epítomos de células T potenciales que permanecen en la molécula. Se identificará que con ciertas moléculas proteínicas, es difícil alterar radicalmente la molécula y retener la actividad completa y así es deseable el uso juicioso del modelado molecular de las variantes y la prueba de un número máximo de variantes. Para el modelado molecular, pueden usarse paquetes de software disponibles comercialmente estándar para modelar la estructura proteínica usando como punto de partida bien una estructura cristalina o bien un modelo construido a partir de homología o predicción del plegamiento proteínico. La información de partes de la proteína implicadas en impartir a la molécula su actividad ayudará a modelar las variantes permitiendo una mejor elección de aminoácidos alterados que retiran un epítomo de células T (o un epítomo de células B opcional) potencial mientras se retiene la actividad.

En el método de la presente invención en el que un número de variantes de proteínas de IFN2 humano alteradas se producirá y probará con respecto a la retención de la actividad deseada, es deseable tener un método de alto rendimiento para rastrear grandes números de variantes. Tales métodos incluyen métodos *in vivo* para la expresión de variantes génicas en células tales como bacterias con aislamiento rápido de las proteínas, por ejemplo usando un anticuerpo para una región conservada de las proteínas, o a través de una etiqueta de purificación de proteínas incluida en la secuencia proteínica. Como una alternativa, pueden usarse en algunos casos métodos *in vitro* tales como transcripción y traducción *in vitro*. Cuando la proteína se une a otra molécula, pueden usarse métodos de presentación tales como presentación en fagos y presentación en ribosomas para seleccionar variantes que retienen la actividad de unión.

En la práctica de la presente invención, pueden efectuarse alteraciones de aminoácidos específicos mediante tecnología de DNA recombinante, de modo que la molécula final puede prepararse mediante la expresión a partir de un huésped recombinante usando métodos establecidos. Sin embargo, el uso de química proteínica o cualquier otro medio de alteración molecular no se excluye en la práctica de la invención. Aunque la presente invención proporciona un método para la retirada de epítomos de células T (y epítomos de células B opcionales) potenciales de moléculas proteínicas, el método no excluye la prueba de moléculas variantes producidas dentro de la invención para la actividad de epítomos de células T reales, incluyendo la prueba de la proteína o partes peptídicas de la misma usando animales transgénicos con las moléculas del MHC de la especie que ha de recibir la proteína terapéutica, o la prueba con animales transgénicos reconstituidos con células del sistema inmunitario procedentes de la especie que ha de recibir la proteína terapéutica.

Aunque tales métodos no son todavía habituales, pueden efectuarse ensayos de células T *in vitro* por los que la proteína de IFN2 puede procesarse y presentarse sobre el MHC clase II mediante células que presentan antígenos (APCs) apropiadas a células T singeneicas. Las respuestas de las células T pueden medirse mediante medidas de proliferación simples (especialmente si las APCs se han irradiado o tratado de otro modo para evitar la proliferación) o midiendo la liberación de citoquinas específicas. Para responder a diferentes alotipos del MHC clase II, se requerirá habitualmente una gama de ensayos *in vivo* para probar ampliamente epítomos de células T. Alternativamente, animales transgénicos equipados con moléculas del MHC clase II humanas (o de la especie deseada) podrían usarse para probar con respecto a epítomos de células T especialmente cuando se ha retirado el repertorio de MHC clase II del huésped y especialmente cuando uno o más de otras moléculas accesorias del huésped en la interacción APC/células T también se han reemplazado por humanas (o de la especie deseada), tales como CD4 en células T.

En un aspecto adicional, la invención proporciona moléculas de IFN2 humano resultantes del método que se describe anteriormente. Tales moléculas pueden ser útiles para tratar o prevenir una enfermedad o un estado. La invención también se extiende al uso de tales moléculas de IFN2 en el diagnóstico *in vivo* e *in vitro* y para uso humano o veterinario. Características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos y viceversa.

La invención se ilustra, pero no se limita, mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se refieren a las siguientes figuras:

la Figura 1 muestra la secuencia proteínica de interferón 2 humano maduro; y

la Figura 2 muestra la secuencia proteínica de una molécula de interferón 2 humano alterada.

Ejemplo

En el presente ejemplo, la proteína de interferón $\alpha 2$ humana se analiza con respecto a la presencia de motivos de unión al MHC potenciales y se describe un método para la retirada de un número de estos de la molécula.

El interferón alfa 2 (INF2) es una citoquina glicoproteínica importante expresada por macrófagos activados. La proteína tiene una actividad antiviral y estimula la producción de al menos dos enzimas, una proteína quinasa y una oligoadenilato sintetasa, durante la unión al receptor de interferón alfa en células que se expresan. La proteína de INF2 madura es un polipéptido simple de 165 aminoácidos producido por el procesamiento postraduccional de una proteína precursora de 188 aminoácidos mediante segmentación de una secuencia de señal de 23 aminoácidos del extremo amino.

La proteína tiene una importancia clínica considerable como un agente antiviral, antiproliferativo e inmunomodulador de amplio espectro. Preparaciones recombinantes y otras de INF2 se han usado terapéuticamente en una variedad de indicaciones cancerosas y virales en el hombre (revisado en Sen, G.G. y Lengyel P, *J. Biol. Chem.* **267** 5017-5020 (1992)). Sin embargo, a pesar del beneficio terapéutico muy significativo para un gran número de pacientes, la resistencia a la terapia en ciertos pacientes ha sido documentada y se ha mostrado que un mecanismo importante de resistencia es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes detectables en el suero de pacientes tratados (Quesada, J.R. y otros, *J. Clin. Oncology* 31522-1528 (1985); Stein R.G. y otros, *New Eng. J. Med.* **318** 1409-1413 (1988); Russo, D. y otros, *Br. J. Haem.* **94** 300-305 (1996); Brooks M.G. y otros, *Gut* **30** 1116-1122 (1989)). En estos pacientes se monta una respuesta inmunitaria hacia el interferón terapéutico a pesar del hecho de que una molécula de estructura primaria al menos idéntica es producida endógenamente en el hombre. En el presente ejemplo, se presenta una molécula de interferón alfa 2 con inmunogenicidad potencial reducida.

Método para la identificación de motivos de unión al MHC clase II potenciales en interferón alfa 2 humano

La secuencia de INF2 se identificó a partir de la base de datos de GenBank. Se usó en todas partes la secuencia con el número de registro P01563. Las secuencias proteínicas de la proteína de INF2 madura se identificaron y la secuencia excluyendo el primer péptido de señal de 23 aminoácidos se analizó con respecto a la presencia de motivos de unión al MHC clase II potenciales (Figura 1). El análisis se efectuó mediante ordenador usando el software MPT versión 1.0 (Biovation, Aberdeen, Reino Unido). Este paquete de software efectúa "enhebrado de péptidos" de acuerdo con los métodos descritos en WO-A-9859244. El software es capaz de proporcionar un índice de unión potencial del péptido a 18 alelos DR del MHC clase II diferentes que cubren más de 96% de los alotipos de HLA-DR existentes en la población humana.

Los resultados del procedimiento de "enhebrado de péptidos" sobre el INF2 indican la presencia de un total de 18 epítomos potenciales individuales. Los epítomos se mapean con respecto a cinco aglomerados distintos de epítomos solapados que abarcan los residuos 7-40 (aglomerado 1), los residuos 45-70 (aglomerado 2), los residuos 79-103 (aglomerado 3), los residuos 108-132 (aglomerado 4) y los residuos 140-163 (aglomerado 5). Cada uno de los cinco aglomerados contiene 5, 3, 4, 3 y 3 epítomos potenciales, respectivamente.

Para priorizar los epítomos para la retirada, los aglomerados de epítomos se mapearon a continuación con respecto a las características de estructura-función conocidas en la molécula. Para una evidencia de INF2 a partir de modelado de homología (Murgolo N.J. y otros, *Proteins: Structure, Function & Genetics* **17** 62-74 (1993)), mutagénesis dirigida al

sitio (Tymms, M.J. y otros, *Antiviral Res.* **12** 37-48 (1989); McInnes B. y otros, *J. Interferon Res.* **9** 305-314 (1989)), moléculas quiméricas de especies cruzadas (Ra, N.B.K. y otros, *J. Biol. Chem.* **263** 8943-8952 (1988); Shafferman, A. y otros *J. Biol. Chem.* **262** 6227-6237 (1987)), mutantes de delección (Wetzel, R. y otros, En: *Interferons* New York Academic Press, pp 819-823 (1982)) y estudios de mapeo serológico (Lydon N.B. y otros, *Biochemistry* **24** 4131-4141 (1985); Trotta P.P. y otros., En: *The Interferon System Dianzani F & Rossi G.B* (eds.) Nueva York, Raven Press, 1985 pp 231-235), sugieren que los epítomos en los aglomerados 1 y 2 son los objetivos de mayor prioridad para la retirada. Con referencia al modelo estructural de Murgolo y otros (Murgolo N.J. y otros (1993) *ibid.*), el aglomerado 1 que presenta 5 epítomos potenciales abarca la hélice A funcionalmente importante y la región de bucle superficial AB de la molécula de INF2. Esta región es importante para la actividad antiviral y está implicada en la unión a la estructura del receptor de INF2 humano. Lo más significativamente, los epítomos para neutralizar anticuerpos se han mapeado con respecto a esta región, específicamente los residuos 10-11 del elemento estructural de la hélice A (Lydon N.B. y otros, (1985) *ibid.*).

Sobre esta base, los epítomos del aglomerado 1 en las posiciones 7-19 y 13-25 se eliminaron mediante la sustitución de leucina por treonina en la posición 15 (L₁₅T usando códigos de una sola letra). Este procedimiento se efectuó interactivamente *in silico* usando el paquete MPTver1. De forma similar, el epítomo del aglomerado 1 en la posición 28-41 se eliminó mediante la sustitución F₂₇Y. Esta última sustitución tenía el efecto concomitante de reducir de 13 a 11 el número de alelos de unión potenciales para el epítomo solapado en la posición 22-34.

Los epítomos del aglomerado 2 se extienden desde el bucle AB a través de la región de la hélice B y hacia el dominio del bucle BC. Se ha mostrado que los anticuerpos neutralizantes se unen en el bucle BC (Lydon N.B. y otros, (1985) *ibid.*; Trotta P.P. y otros., (1985) *ibid.*), por lo tanto, el epítomo del aglomerado 2 en la posición 58-70 también se fijó como objetivo para la retirada. La sustitución N₆₅L reduce la inmunogenicidad potencial en esta región eliminando 3 epítomos solapados que abarcan las posiciones 61-77, que colectivamente se predice que se unen a 5 alelos DR del MHC diferentes. Adicionalmente, esta sustitución también reduce de 5 a 3 el número de diferentes alelos de unión en el epítomo 58-70.

Otros aglomerados de epítomos (por ejemplo, 3-5) se mapean con respecto a regiones enterradas de la molécula o regiones superficiales no implicadas en la unión al receptor y de ahí que proporcionen sitios antigénicos para los que las respuestas de anticuerpos son principalmente no neutralizantes.

Usando el método anterior, se recopiló una secuencia proteínica de INF2 alterada que contenía 3 sustituciones a partir de la secuencia de partida y se representa en la Figura 2. Se predice que esta secuencia es significativamente menos inmunogénica con respecto a la presentación del MHC clase II humano. Las áreas de inmunogenicidad reducida se enfocaban a regiones de la molécula en las que se ha observado que se produce neutralización mediada por anticuerpos de la proteína con el potencial de limitar la eficacia clínica de la molécula como una entidad terapéutica.

Método para la construcción de molécula de interferón alfa 2 alterada

Un gen de INF2 silvestre fue sintetizado bajo contrato por Genosys Biotechnologies Ltd (Cambridge, Reino Unido). El gen se construyó mediante PCR usando cebadores de DNA sintéticos solapados largos (80-meros) y la secuencia dada en el número de registro de GenBank M29883. El gen sintético se clonó como un fragmento de restricción de *EcoRI-HindIII* al vector de expresión bacteriana pMEX8 (MoBiTec, Gottingen, Alemania). Se confirmó que la secuencia génica era idéntica al gen deseado usando sistemas de reactivos disponibles comercialmente e instrucciones proporcionadas por el suministrador (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido).

Se construyeron versiones alteradas (inmunogenicidad reducida) de la proteína mediante mutagénesis dirigida al sitio del gen silvestre en pMEX8. La mutagénesis se efectuó usando oligonucleótidos sintéticos cortos (18-meros) obtenidos comercialmente (Genosys, Cambridge, Reino Unido) y el procedimiento de "cambio rápido" y reactivos de Stratagene (Cambridge, Reino Unido). Después de la mutagénesis dirigida al sitio, las secuencias de DNA de clones seleccionados se confirmaron como previamente.

Para la expresión de proteínas de INF2 silvestre recombinante y variante recombinante, plásmidos de expresión pMEX8-INF2 se transformaron en *E. coli* cepa JA221 y las células se hicieron crecer y se recogieron usando procedimientos estándar (Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989) *ibid.*). Se preparó INF2 recombinante esencialmente como se describe previamente (Grosfeld, H. y otros, en *Advances in Biotechnological Processes 4*, Mizrahi A. y Van Wezel A. L. eds., pp 59-78, Alan R. Liss Inc, Nueva York (1985)) con pequeñas modificaciones. Brevemente, después de la centrifugación a alta velocidad, el sobrenadante se concentró mediante saturación al 60% de sulfato amónico y a continuación se cromatografió sobre una columna Sephadex G-75 de 2,7 x 68 cm equilibrada con PBS más NaCl 0,5M. Se recogieron fracciones (8 ml) a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones reunidas se purificaron adicionalmente usando una columna de inmunoafinidad como la descrita previamente (Grosfeld, H. y otros, (1985) *ibid.*). Las proteínas purificadas se ensayaron usando análisis de SDS-PAGE y la actividad funcional (actividad antiviral) se determinó usando ensayos biológicos como los descritos previamente (Shafferman, A. y otros, *J. Biol. Chem.* **262** 6227-6237 (1987)).

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para hacer al interferón alfa 2 (IFN2) humano no inmunogénico o menos inmunogénico para un ser humano en comparación con IFN2 no modificado cuando se usa *in vivo* el método, comprendiendo el método:
- (a) determinar al menos parte de la secuencia de aminoácidos de INF2 humano maduro;
 - (b) identificar epítomos de células T potenciales analizando dicha secuencia con respecto a la presencia de
10 motivos que se unen al MHC clase II humano, y
 - (c) eliminar de dicha secuencia de aminoácidos al menos uno de dichos epítomos de células T identificados de acuerdo con la etapa b), reduciendo de ese modo la inmunogenicidad de IFN2 cuando se expone al sistema inmunitario de un ser humano.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los epítomos de células T se identifican mediante enhebrado de péptidos computacional.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que los epítomos de células T identificados se priorizan usando características de estructura-función de IFN2.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que un epítomo de células T se elimina mediante la substitución de uno o más aminoácidos dentro del propio epítomo.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la molécula de IFN2 alterada tiene la secuencia proteínica que se representa en la Figura 2.
6. Un interferón alfa 2 (IFN2) humano alterado que tiene la secuencia proteínica que se representa en la Figura 2 y que tiene una inmunogenicidad reducida con respecto a la presentación de MHC clase II humano.

30

35

40

45

50

55

60

65

**CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFOKAETIPVLHEMIQQI
FNLFS TKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRI
TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE**

FIGURA 1

Secuencia proteínica de interferón alfa 2 humano maduro

**CDLPQTHSLGSRRTTMLLAQMRKISLFYCLKDRHDFGFPQEEFGNQFOKAETIPVLHEMIQQI
FLLFS TKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRI
TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE**

FIGURA 2

Secuencia proteínica de una molécula de interferón alfa 2 humano alterada

ES 2 278 463 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Biovation Limited
 <120> Modificación de la Inmunogenicidad de Proteínas
 5 <130> P22184WO
 <140> PCT/GB99/04119
 <141> 1999-12-08
 10 <150> GB9826925.1
 <151> 1998-12-08
 <150> GB9902139.6
 <151> 1999-02-02
 15 <160> 26
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 20 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 25

```

    Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Thr Met
      1              5              10              15

    Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Tyr Cys Leu Lys Asp
              20              25              30

    Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
              35              40              45

    Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
              50              55              60

    Leu Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
      65              70              75              80

    Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
              85              90              95

    Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
              100              105              110

    Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
      115              120              125

    Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
      130              135              140

    Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
      145              150              155              160

    Leu Arg Ser Lys Glu
              165
  
```