



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 167**

51 Int. Cl.:

|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| <b>G06F 19/00</b> (2006.01)  | <b>C12N 9/88</b> (2006.01)   |
| <b>C07K 14/505</b> (2006.01) | <b>C07K 16/30</b> (2006.01)  |
| <b>C07K 14/575</b> (2006.01) | <b>C07K 14/545</b> (2006.01) |
| <b>C07K 14/475</b> (2006.01) | <b>C07K 14/535</b> (2006.01) |
| <b>C07K 14/50</b> (2006.01)  | <b>C07K 14/525</b> (2006.01) |
| <b>C12N 9/24</b> (2006.01)   | <b>C12N 9/64</b> (2006.01)   |
| <b>C12N 9/54</b> (2006.01)   | <b>C07K 14/59</b> (2006.01)  |
| <b>C07K 14/415</b> (2006.01) | <b>C07K 14/47</b> (2006.01)  |
| <b>C07K 16/18</b> (2006.01)  | <b>C07K 16/28</b> (2006.01)  |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02726112 .2**

96 Fecha de presentación : **18.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1366455**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54 Título: **Método para identificar epítotos de células T y método para preparar moléculas con inmunogenicidad reducida.**

30 Prioridad: **19.02.2001 EP 01103954**  
**08.03.2001 EP 01105777**  
**15.03.2001 EP 01106538**  
**15.03.2001 EP 01106536**  
**20.03.2001 EP 01107012**  
**20.03.2001 EP 01106899**  
**27.03.2001 EP 01107568**  
**25.04.2001 EP 01110220**  
**30.05.2001 EP 01113228**  
**19.10.2001 EP 01124965**  
**12.11.2001 EP 01126859**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2008**

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH**  
**Frankfurter Strasse 250**  
**64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es: **Carr, Francis, J.;**  
**Carter, Graham;**  
**Jones, Tim;**  
**Williams, Stephen y**  
**Hamilton, Anita**

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

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 identificar epítopes de células T y método para preparar moléculas con inmunogenicidad reducida.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una nueva estrategia para identificar epítopes de células T que dan lugar a una reacción inmune en un hospedador vivo que comprende el cálculo de valores de posibles epítopes T para los sitios de unión a la molécula de MHC de clase II en un péptido mediante métodos asistidos por ordenador. La invención además se refiere a métodos para preparar moléculas biológicas, sobre todo proteínas y anticuerpos que inducen una respuesta inmunogénica cuando se exponen a un hospedador, preferiblemente a un humano. Mediante este método pueden prepararse moléculas que tengan inmunogenicidad reducida o nula cuando se exponen al sistema inmune de una especie determinada y se compara con la entidad relacionada no modificado mediante reducción o eliminación de los posibles epítopes de células T dentro de la secuencia de dichas moléculas originalmente inmunogénicas. Por tanto, la invención se refiere también moléculas biológicas nuevas obtenidas mediante el método de la invención.

**Antecedentes de la invención**

El uso terapéutico de diversos péptidos, polipéptidos y proteínas está limitado debido a su inmunogenicidad en mamíferos, especialmente en humanos. Por ejemplo, cuando se administran anticuerpos murinos a pacientes que no está inmunodeprimidos, la mayoría de estos pacientes muestran una reacción inmune frente al material extraño introducido produciendo anticuerpos humanos anti-murino (HAMA) (p. ej., Schroff, R. W. y col. (1985) *Cancer Res.* 45: 879-885; Shawler, D.L. y col. (1985) *J. Immunol.* 135: 1530-1535). Existen dos consecuencias graves. En primer lugar, los anticuerpos antimurinos del paciente pueden unirse y aclarar el anticuerpo terapéutico o el inmunoconjugado antes de que tenga ocasión de unirse, por ejemplo, a un tumor, y llevar a cabo su función terapéutica. En segundo lugar, el paciente puede desarrollar una sensibilidad alérgica al anticuerpo murino y estar en riesgo de un choque anafiláctico ante cualquier exposición futura a una inmunoglobulina murina.

Se han empleado varias técnicas para abordar el problema HAMA y, de este modo, permitir el uso en seres humanos de anticuerpos monoclonales terapéuticos (véase, por ejemplo los documentos WO-A-8909622, EP-A-0239400, EP-A-0438310 y WO-A-9109967). Estas técnicas de ADN recombinante generalmente han reducido la información genética del ratón en la construcción final del anticuerpo al tiempo que aumenta la información genética humana en la construcción final. No obstante, los anticuerpos "humanizados" resultantes, en varios casos, siguen induciendo una respuesta inmune en los pacientes (Isaacs, J. D. (1990) *Sem. Immunol.* 2: 449-456; Rebello, P. R. y col. (1999) *Transplantation* 68: 1417-1420).

Un aspecto común de estas metodologías ha sido la introducción en el anticuerpo terapéutico, normalmente originario de un roedor, de restos de aminoácidos, incluso en fragmentos significativos de secuencias de restos de aminoácidos, idénticos a los que se presentan en las proteínas de anticuerpo humano. En el caso de anticuerpos, este proceso es posible debido al grado relativamente alto de conservación estructural (y funcional) entre las moléculas de anticuerpo de diferentes especies. En el caso de posibles péptidos, polipéptidos y proteínas terapéuticos, sin embargo, donde puede que no exista homología estructural en la especie hospedadora (p. ej., humano) para la proteínas terapéutica, no pueden aplicarse estos procesos. Además, estos métodos han supuesto que la introducción general de una secuencia de restos de aminoácidos humanos hará que el anticuerpo remodelado sea no inmunogénico. Sin embargo, es sabido que pueden liberarse determinadas secuencias peptídicas cortas ("epítopes de células T") durante la degradación de péptidos, polipéptidos o proteínas dentro de las células y, posteriormente, son presentadas por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con el fin de desencadenar la activación de las células T. En el caso de los péptidos presentados por el MHC de clase II, esta activación de las células T puede dar lugar entonces a una respuesta de anticuerpo mediante la estimulación directa de células B para producir dichos anticuerpos. Por consiguiente, sería conveniente eliminar los posibles epítopes de células T de un péptido, polipéptido o proteína. Incluso proteínas de origen humano y con las mismas secuencias de aminoácidos que las que existen en humanos pueden inducir una respuesta inmune en seres humanos. Entre los ejemplos destacables se incluye el uso terapéutico del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (Wadhwa, M. y col. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 1353-1361) e interferón alfa 2 (Russo, D. y col. (1996) *Bri. J. Haem.* 94: 300-305; Stein, R. y col. (1988) *New Engl. J. Med.* 318: 1409-1413).

Se ha descrito previamente la eliminación de epítopes de células T de las proteínas (véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Los métodos generales descritos en la técnica previa comprenden las siguientes etapas:

- (a) Determinar la secuencia de aminoácidos del polipéptido o de parte del mismo.
- (b) Identificar un o mas posibles epítopes de células T en la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante cualquier método que incluya la determinación de la unión de los péptidos a las moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos.
- (c) Diseñar nuevas variantes de secuencia con uno o más aminoácidos en los posibles epítopes de células T modificados de modo que se reduzca sustancialmente o se elimine la actividad del epítope de células T según se determina mediante la unión de los péptidos a las moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o

*in silico*, o ensayos biológicos. Estas variantes de secuencia se construyen de modo que se evite la creación de nuevos posibles epítopes de células T mediante las variaciones de secuencia excepto que estos nuevos posibles epítopes de células T, a su vez, se modifiquen de modo que se reduzca sustancialmente o se elimine la actividad del epítopo de células T.

- (d) Construir estas variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y analizar dichas variantes para identificar una o más variantes con las propiedades deseables.

En la técnica se han utilizado otras técnicas que aprovechan los complejos solubles de moléculas de MHC recombinantes en combinación con péptidos sintéticos y que son capaces de unirse a clones de células T de muestras de sangre periféricas de seres humanos o animales de experimentación [Kern, F. y col. (1998) *Nature Medicine* 4:975-978; Kwok, W.W. y col. (2001) *TRENDS in Immunology* 22: 583-588] y puede aprovecharse también en una técnica de identificación de epítopes.

Los posibles epítopes de células T se definen generalmente como cualquier secuencia de restos de aminoácidos con capacidad para unirse a moléculas de MHC de clase II. Pueden medirse estos posibles epítopes de células T para establecer la unión a MHC. En la expresión “epítopo de células T” está implícito un epítopo que cuando se une a moléculas de MHC pueden ser reconocido por el receptor de las células T y que pueden, al menos en principio, causar la activación de estas células T. Sin embargo, normalmente se entiende que determinados péptidos que se encuentran unidos a moléculas de MHC de clase II, puede quedar retenidos en una secuencia proteica debido a que estos péptidos son tolerados por el sistema inmune del organismo al cual se administra la proteína final.

La invención se diseña para superar la realizada práctica de que las proteínas solubles introducidas en un hospedador autólogo con intención terapéutica, pueden desencadenar una respuesta inmune dando lugar al desarrollo de anticuerpos en el hospedador que se unen a la proteína soluble. Un ejemplo entre otros, es el interferón alfa 2 contra el que una proporción de pacientes humanos sintetizan anticuerpos a pesar del hecho de que esta proteína se produzca de forma endógena [Russo D, y col. (1996) *Brit. J. Haem.* 94: 300-305; Stein, R. y col. (1988) *New Engl. J. Med.* 318: 1409-1413].

Las moléculas de MHC de clase II son un grupo de proteínas muy polimórficas que tienen una función central en la sección y activación de células T colaboradoras. El grupo de antígenos leucocitarios humanos DR (HLA-DR) son los isotipos predominantes de este grupo de proteínas y el objetivo principal de la presente invención. Sin embargo, los isotipos HLA-DQ y HLA-DP llevan a cabo funciones similares, por lo que la presente invención se aplica por igual a ambos. Los moléculas HLA-DR del MHC son homodímeros donde cada “mitad” es un heterodímero que está compuesto de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Cada heterodímero tiene un dominio de unión al ligando que se une a péptidos que tiene una longitud que varía entre 9 y 20 aminoácidos, aunque el surco de unión puede acomodar un máximo de 9 a 11 aminoácidos. El dominio de unión al ligando está compuesto de los aminoácidos 1 a 85 de la cadena  $\alpha$  y los aminoácidos 1 a 94 de la cadena  $\beta$ . Se ha demostrado recientemente que las moléculas DQ tienen una estructura homólogo y también se espera que las proteínas de la familia DP sean muy similares. En humanos, se conocen aproximadamente 70 alotipos diferentes para el isotipo DR, para DQ hay 30 alotipos diferentes y para DP se conocen 47 alotipos diferentes. Cada individuo porta de dos a cuatro alelos DR, dos DQ y dos alelos DP. Se ha resuelto la estructura de varias moléculas DR y estas estructuras señalan a un surco de unión a péptidos de extremo abierto con varios bolsillos hidrófobos que acoplan restos hidrófobos (restos del bolsillo) del péptido [Brown y col. *Nature* (1993) 364: 33; Stern y col. (1994) *Nature* 368: 215]. El polimorfismo que identifica los diferentes alotipos de la molécula de clase II contribuye a una amplia diversidad de diferentes superficies de unión para péptidos dentro del surco de unión a péptidos y a nivel poblacional asegura una flexibilidad máxima con respecto a la capacidad para reconocer proteínas extrañas y organizar una respuesta inmune frente a organismos patógenos.

Existe una cantidad considerable de polimorfismo dentro del dominio de unión al ligando con distintas “familias” dentro de poblaciones geográficas y grupos étnicos diferentes. Este polimorfismo afecta a las características de unión del dominio de unión a péptidos, por lo que diferentes “familias” de moléculas DR tendrán especificidades para péptidos con diferentes propiedades de secuencia, aunque puede haber cierto solapamiento. Esta especificidad determina el reconocimiento de epítopes de células Th (respuesta de células T específicas de clase II) que finalmente son responsables de dirigir la respuesta de anticuerpos a epítopes de células B presentes en la misma proteína de la que procede el epítopo de células Th. Por tanto, la respuesta inmune frente a una proteína en un individuo está muy influenciada por el reconocimiento del epítopo de células T que es una función de la especificidad de unión a péptidos del alotipo HLA-DR del individuo. Por tanto, para identificar epítopes de células T dentro de una proteína o de un péptido en el contexto de una población global, es conveniente considerar las propiedades de unión de un conjunto de alotipos HLA-DR lo más diverso posible, abarcando de este modo el porcentaje de población mundial más elevado posible.

Un factor principal en la inducción de una respuesta inmune es la presencia en la proteína de péptidos que puede estimular la actividad de las células T mediante la presentación en el contexto de las moléculas MHC de clase II. Para eliminar o reducir la inmunogenicidad es, por tanto, deseable identificar y eliminar de la proteína los epítopes de células T.

Las moléculas biológicas sin modificar pueden producirse mediante tecnologías de recombinación que son bien conocidos *per se* en la técnica, usando varios tipos de células hospedadoras diferentes.

Sin embargo, existe una continua necesidad de análogos de dichas moléculas biológicas con propiedades mejoradas. Entre las mejoras deseadas se incluyen esquemas y modalidades alternativas para la expresión y purificación de dichas mejoras terapéuticas, pero también y especialmente, en las propiedades biológicas de la proteína. Exista una necesidad especial de mejora de las características *in vivo* cuando se administran a un humano. A este respecto, es muy deseable proporcionar la molécula biológica seleccionada con un potencial reducido o ausente para inducir una respuesta inmune en humanos. Cabría esperar que estas proteínas muestren un aumento en el tiempo en circulación en el humano y sería especialmente beneficioso en el ámbito de enfermedades crónicas o recurrentes, como es el caso de varias indicaciones para dicha molécula biológica.

## 10 Resumen de la invención

La presente invención se refiere, por tanto, a dos aspectos generales:

(a) un método por ordenador conveniente y eficaz para la identificación y el cálculo de epítopes de células T para un número globalmente diverso de moléculas MHC de clase II y, en función de este conocimiento, para diseñar y construir nuevas variantes de secuencia de moléculas biológicas con propiedades mejoradas y

(b) nuevas moléculas biológicamente activas para su administración especialmente a humanos y, en particular, para uso terapéutico; dichas moléculas biológicas son, según la invención, polipéptidos, proteínas o inmunoglobulinas (anticuerpos) modificados producidos según el método de la invención, en el que la modificación da lugar a una reducción de la propensión de la molécula biológica a inducir una respuesta inmune tras su administración a un humano.

La invención se refiere en particular a la modificación de varias proteínas y anticuerpos generalmente bien conocidos con un elevado beneficio terapéutico de origen humano o no humano obtenidos mediante el procedimiento de la invención para dar lugar a proteínas que sean sustancialmente no inmunogénicas o menos inmunogénicas que cualquier equivalente no modificado cuando se utilizan *in vivo*. Cabría esperar que las moléculas modificadas según el nuevo método de esta invención mostraran un aumento del tiempo en circulación en humanos y podrían ser especialmente beneficioso en ámbitos de enfermedades crónicas o recurrentes como es el caso de diversas indicaciones. La presente invención proporciona, como realizaciones específicas y para demostrar la eficacia del método de la invención, formas modificadas de dichas moléculas que se espera muestren propiedades mejoradas *in vivo*. Estas moléculas con inmunogenicidad modificada, es decir, que presentan una posible disminución de la inmunogenicidad, pueden usarse en composiciones farmacéuticas. Dichas moléculas modificadas se denominan en este documento “inmunogénicamente” modificadas.

Puede utilizarse un método para identificar parcialmente epítopes de células T mediante un sistema informático para calcular los valores teóricos de los epítopes de células T e identificar, de este modo, péptidos de unión a la molécula MHC de clase II dentro de una proteína; en el que el sitio de unión comprende una secuencia de sitios de aminoácidos dentro de la proteína. Posteriormente, los péptidos identificados pueden modificarse sin reducir sustancialmente, y posiblemente aumentado, el valor terapéutico de la proteína. Este método por ordenador comprende seleccionar una región de la proteína que tiene una secuencia de restos de aminoácidos conocidas, muestrear de forma secuencial segmentos de restos de aminoácidos (ventanas) solapantes de tamaño uniforme predeterminado y compuestos de al menos tres restos de aminoácidos a partir de la región seleccionada, calcular la puntuación de unión a la molécula MHC de clase II para cada segmento probado e identificar al menos uno de los segmentos probados adecuados para la modificación, en función de la puntuación de unión a la molécula MHC de clase II calculado para ese segmento. La puntuación de unión a MHC de clase II global para el péptido puede cambiarse a continuación sin reducir sustancialmente el valor terapéutico de la proteína.

La puntuación de unión de la molécula MHC de clase II para un segmento de restos de aminoácidos seleccionado en un aspecto de esta invención se calcula sumando los valores asignados a cada cadena lateral de los restos de aminoácidos hidrófobos presente en el segmento de restos de aminoácidos probado del péptido. Para generar una visión general gráfica, el valor de esa suma puede asignarse a continuación a un único resto de aminoácido aproximadamente en el punto medio del segmento. Este procedimiento se repite para cada uno de los segmentos solapantes (ventanas) en la región o regiones peptídicas de interés. El valor asignado para cada cadena aromática presente es aproximadamente la mitad del valor asignado para cada cadena lateral alifática hidrófoba. Las cadenas laterales alifáticas hidrófobas son aquellas presentes en valina, leucina, isoleucina y metionina. Las cadenas laterales aromáticas son aquellas presentes en fenilalanina, tirosina y triptófano. El valor asignado preferido para una cadena lateral aromática es de aproximadamente 1 y para una cadena lateral alifática es de aproximadamente 2. Sin embargo, pueden utilizarse otros valores.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un método por ordenador adecuado para identificar uno o más péptidos posibles epítopes de células T dentro de la secuencia de aminoácidos de una molécula biológica por etapas que incluyen la determinación de la unión de dichos péptidos a moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico*, o ensayos biológicos, este método comprende las siguientes etapas:

(a) seleccionar una región del péptido que tenga una secuencia de restos de aminoácidos conocida;

(b) muestrear secuencialmente segmentos de restos de aminoácidos solapantes de tamaño uniforme predeterminado y constituidos por al menos tres restos de aminoácidos de la región seleccionada;

(c) calcular la puntuación de unión a la molécula MHC de clase II para cada uno de dichos segmentos muestreados mediante la suma de los valores asignados a cada cadena lateral de restos de aminoácidos hidrófobos presente en dicho segmento de restos de aminoácidos muestreados e

(d) identificar al menos uno de estos segmentos adecuado para la modificación, en función de la puntuación de unión a la molécula MHC de clase II para ese segmento, para cambiar la puntuación de unión global al MHC de clase II global para el péptido sin reducir sustancialmente la utilidad terapéutica del péptido, caracterizado porque la etapa (c) se lleva a cabo usando una función de puntuación de Böhm modificada para incluir el término de repulsión de energía ligando-proteína de van der Waal 12-6 y el término de energía conformación al del ligando

- (1) proporcionar una primera base de datos de modelos de moléculas MHC de clase II;
  - (2) proporcionar una segunda base de datos de cadenas principales peptídicas permitidas para dichos modelos de moléculas MHC de clase II;
  - (3) seleccionar un modelo a partir de dicha primera base de datos;
  - (4) seleccionar una cadena principal peptídica permitida a partir de dicha segunda base de datos;
  - (5) identificar cadenas laterales de restos de aminoácidos presentes en cada segmento muestreado;
  - (6) determinar el valor de afinidad de unión para todas las cadenas laterales presentes en cada segmento muestreado;
- y opcionalmente
- (7) repetir los pasos (1) a (5) para cada uno de dichos modelos y cadenas principales.

En una realización adicional, la puntuación de unión para cada secuencia muestreada se calcula (i) proporcionando una primera base de datos de modelos de moléculas MHC de clase II; (ii) proporcionando una segunda base de datos de cadenas principales peptídicas permitidas para dichos modelos de moléculas MHC de clase II; (iii) proporcionando una tercera base de datos de conformaciones de cadena lateral de aminoácidos para cada uno de los veinte aminoácidos en cada posición de cada cadena principal; (iv) seleccionando un modelo de la primera base de datos; (v) seleccionando una cadena principal peptídica permitida de dicha segunda base de datos; (vi) identificando cadenas laterales de restos de aminoácidos en cada segmento muestreado en cada conformación permitida; (vii) determinando el valor de afinidad de unión óptimo para todas las cadenas laterales presentes en cada segmento muestreado en cada conformación permitida; (viii) repitiendo las etapas (v) a (vii) para cada esqueleto y determinando la puntuación de unión óptima; y (ix) repitiendo las etapas (iv) a (viii) para cada uno de los modelos.

Debe entenderse que las tres bases de datos descritas anteriormente pueden combinarse en una única base de datos o dos cualesquiera de las bases de datos pueden combinarse proporcionando una base de datos combinada. Puede variar la longitud de los segmentos de restos de aminoácidos que se van a muestrear. Preferiblemente, los segmentos de restos de aminoácidos muestreados puede estar compuestos por aproximadamente 10 a aproximadamente 15 restos de aminoácidos, más preferiblemente por aproximadamente 13 restos de aminoácidos.

Los segmentos de restos de aminoácidos muestreados pueden solaparse en un grado variable. Preferiblemente, los segmentos de restos de aminoácidos muestreados se solapan sustancialmente. Más preferiblemente, los segmentos de restos de aminoácidos consecutivos muestreados se solapan unos con otros en todos excepto un resto de aminoácido. Es decir, en un segmento de restos de aminoácidos que tiene n restos, se solapan n-1 restos con el siguiente segmento de restos de aminoácidos muestreado consecutivo.

Por tanto, en más detalle, la invención se refiere además a las siguientes realizaciones preferidas:

- un método especificado en consecuencia, en el que el valor asignado para cada cadena aromática presente es de aproximadamente la mitad del valor asignado para cada cadena lateral alifática hidrófoba;
- un método especificado en consecuencia, en el que el segmento de restos de aminoácidos muestreado está compuesto por 13 restos de aminoácidos;
- un método especificado en consecuencia, en el que los segmentos de restos de aminoácidos consecutivos muestreados se solapan en uno a cinco restos de aminoácidos;
- un método especificado en consecuencia, en el que los segmentos de restos de aminoácidos consecutivos muestreados se solapan sustancialmente entre sí;
- un método especificado en consecuencia, en el que se solapan todos excepto uno de los restos de aminoácidos de los segmentos de restos de aminoácidos consecutivos muestreados.

En un segundo aspecto básico, la presente invención proporciona formas modificadas de moléculas biológicas diferentes en las que se han eliminado uno o más epítopes de células T, en el que dicha modificación puede lograrse mediante los métodos descritos anteriormente y en las reivindicaciones. Las moléculas también pueden obtenerse mediante los métodos descritos en la técnica previa citada anteriormente; sin embargo, las moléculas obtenidas mediante los métodos de esta invención muestran propiedades mejoradas. En los resultados previos de la técnica, los epítopes de células T predichos se eliminan usando sustituciones razonables de aminoácidos dentro de la secuencia primaria del anticuerpo o la proteína no anticuerpo terapéuticos, tanto de origen humano como no humano.

La presente invención proporciona formas modificadas de proteínas e inmunoglobulinas que se prevé muestren propiedades mejoradas *in vivo*.

Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar un método para preparar una molécula biológica inmunogénicamente modificada derivada de una molécula parental, en el que la molécula modificada tiene una secuencia de aminoácidos diferente con respecto a dicha molécula parental y mostrar una inmunogenicidad reducida con respecto a la molécula parental cuando se expone al sistema inmune de una especie determinada; dicho método comprende: (i) determinar la secuencia de aminoácidos de la molécula biológica parental o de parte de la misma; (ii) identificar uno o más posible epítopes de células T dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína por cualquier método, como la determinación de la unión de los péptidos a moléculas de MHC mediante el uso de técnicas *in vitro* o *in silico*, o ensayos biológicos, (iii) diseñar nuevas variantes de secuencia mediante la alteración de al menos un resto de aminoácido dentro de las secuencias de epítopes de células T originalmente identificadas; dichas variantes se modifican de modo que se reduce sustancialmente o se elimina la actividad o el número de secuencias de epítopes de células T y/o el número de alotipos de MHC capaces de unirse a péptidos derivados de dicha molécula biológica, como se determina mediante la unión de los péptidos de las moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos, o mediante la unión de los complejos péptido-MHC a las células T, (iv) construir estas variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y probar dichas variantes para identificar una o más variantes con propiedades deseables y (v), opcionalmente, repetir las etapas (ii) a (iv), en las que la identificación de las secuencias de epítopes de células T según la etapa (ii) se consigue mediante un método especificado anteriormente y más adelante.

Las realizaciones específicas de la etapa (iii) según la invención se refieren a las siguientes etapas resumidas:

- un método especificado en consecuencia, en el que se alteran de 1 a 9 restos de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de epítopes de células T originalmente presentes;
- un método especificado en consecuencia, en el que se altera un resto de aminoácido de cualquiera de las secuencias de epítopes de células T originalmente presentes;
- un método especificado en consecuencia, en el que la alteración de los aminoácidos se realiza con referencia a una secuencia proteica homóloga y/o a técnicas de modelado *in silico*;
- un método especificado en consecuencia, en el que la alteración de los restos de aminoácidos es sustitución, delección o adición de los restos de aminoácidos originalmente presentes por otros restos de aminoácidos en posiciones específicas;
- Un método especificado en consecuencia, en el que se lleva a cabo adicionalmente una alteración adicional, preferiblemente mediante sustitución, adición o delección de aminoácidos específicos, para reestablecer la actividad biológica de dicha molécula biológica.

A excepción de la etapa (ii), el resto de las etapas del método descrito pueden conseguirse mediante métodos y técnicas que son bien conocidos por expertos en la materia. Puesto que las moléculas biológicas modificadas se preparan preferiblemente mediante tecnologías recombinantes para construcciones de ADN que se dedujeron de la secuencia de aminoácidos después de haber completado el intercambio de restos de aminoácidos identificados por el método de la etapa (i). Las técnicas recombinantes usadas en este documento son bien conocidas en la técnicas (p. ej., Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, EE.UU.).

La molécula biológica obtenida según la invención es preferiblemente un péptido, una proteína, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una proteína de fusión. La invención incluye además modificaciones, variantes, mutaciones, fragmentos, derivados, formas no glucosiladas o glucosiladas parcial o completamente de estas moléculas que tiene la misma o similar actividad biológica y/o farmacológica.

Aunque el método descrito en esta invención no se limita a moléculas biológicas específicas, una realización específica de la invención es proporcionar preferiblemente moléculas bien conocidas en la técnica y que muestran un beneficio y valor terapéutico. Por tanto, un objeto adicional de la invención es proporcionar una molécula biológica inmunogénicamente modificada derivada de una molécula parental, donde la molécula modificada tiene una secuencia de aminoácidos diferente con respecto a dicha molécula parental y muestra una inmunogenicidad reducida con respecto a la molécula parental cuando se expone al sistema inmune de una especie determinada, obtenido mediante el método de la invención como se describe en detalle anteriormente y a continuación.

## ES 2 309 167 T3

Las moléculas biológicas de especial interés obtenidas mediante este método se seleccionan a partir de los grupos:

(a) *anticuerpos monoclonales*:

anticuerpo anti-antígeno glucoproteína de 40kD KS 1/4,  
anticuerpo anti-GD2 14.18  
anticuerpo anti-Her2 4D5 (murino) y su versión humanizada (Herceptin®),  
anticuerpos anti-Her1 (EGFR) c225 y h425  
anticuerpo anti-IL-2R (anti-Tac) (Zenapax®),  
anticuerpo anti-CD25 (CAMPATH®);  
anticuerpos anti-CD20 (C2BA, Rituxan®; Bexxar®)  
anticuerpo dirigido contra la proteína del complemento C5 humano

(b) *proteínas humanas*:

sTNF-R1, sTNF-R2, sTNFR-Fc (Enbrel®),  
proteína C, acrp30, ricina A, ligandos de CNTFR  
subtilisina, GM-CSF, hormona estimulante del folículo humana (h-fsh)  
 $\beta$ -glucocerebrosidasa, GLP-1, apolipoproteína A1,  
Leptina (proteína de la obesidad humana), KGF, G-CSF,  
BDNF, EPO, antagonista de IL-1R.

El tercer aspecto básico de la presente invención se refiere a las secuencia de epítopes de células T que procede de las moléculas biológicas inmunogénicamente no modificada parental. Preferiblemente, estos epítopes son péptidos 13mer. Dentro de estas secuencias peptídicas, se prefieren aquellas que tienen 9 restos de aminoácidos consecutivos. Por tanto, es otro objeto de la invención proporcionar acceso a estos epítopes y secuencias. Con más detalle, la invención se refiere a:

- un uso de un posible péptido epítope de células T dentro de la secuencia de aminoácidos de una molécula biológica parental inmunogénicamente no modificada identificada según cualquiera de los métodos descritos para preparar una molécula biológica con inmunogenicidad reducida con la misma actividad biológica;
- un uso correspondiente de un posible péptido epítope de células T, en el que dicho epítope de células T es un péptido 13mer;
- un uso de una secuencia peptídica que está compuesta de al menos 9 restos de aminoácidos consecutivos de un epítope de células T 13mer como se especifica anteriormente para preparar una molécula biológica con inmunogenicidad reducida con la misma actividad biológica en comparación con la molécula parental no modificada.

### Breve descripción de los dibujos

la Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un aspecto del presente método por ordenador;

la Figura 2 es un diagrama de flujo que muestra la generación de una base de datos para un método por ordenador como realización de la presente invención;

la Figura 3 es un diagrama de flujo que muestra la consulta en la base de datos para realizar el perfil de un péptido ante posibles epítopes de células T;

la Figura 4 es un diagrama de flujo adicional que muestra el método por ordenador;

la Figura 5 es una representación del índice de probabilidad de epítopes de células T frente a las coordenadas (posiciones) de restos de aminoácidos de la isoforma (GAD 65) de ácido glutámico descarboxilasa (PM: 65.000);

la Figura 6 es una representación del índice de probabilidad de epítopes de células T frente a las coordenadas (posiciones) para la eritropoyetina (EPO);

la Figura 7 es una representación del índice de probabilidad de epítopes de células T frente a las coordenadas (posiciones) para la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-A33 humanizado y

la Figura 8 es una representación del índice de probabilidad de epítopes de células T frente a las coordenadas (posiciones) para la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-A33 humanizado.

En la figura 5 a 8 anteriores, la línea continua (—) representa un índice de epítopes de células T calculado mediante un método de ordenador según el diagrama de flujo mostrado en la Figura 1, y la línea de puntos (●●●●) representa el número previsto de epítopes de células T calculado según el método de cálculo de acuerdo con el diagrama de flujo mostrado en la Figura 3 según otro aspecto de la presente invención.

## 15 Descripción detallada de la invención

La expresión “epítopo de células T” significa según se entiende en esta invención, una secuencia de aminoácidos que es capaz de unirse con una eficiencia razonable a moléculas MHC de clase II (o su equivalente en una especie distinta al ser humano), capaz de estimular a las células T y/o también unirse (sin una activación necesariamente cuantificable) a células T formando un complejo con MHC de clase II.

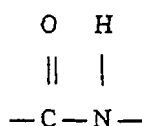
El término “péptido”, según se utiliza en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, es un compuesto que incluye dos o más aminoácidos. Los aminoácidos están unidos entre sí mediante un enlace peptídico (definido a continuación en este documento). Existen 20 aminoácidos naturales diferentes implicados en la producción biológica de péptidos y pueden unirse cualquier número en cualquier orden para formar una cadena o anillo peptídico. Los aminoácidos naturales empleados en la producción biológica de péptidos tienen todos la configuración L. Pueden prepararse péptidos sintéticos empleando métodos de síntesis convencionales, utilizando L-aminoácidos, D-aminoácidos o diversas combinaciones de aminoácidos de las dos configuraciones diferentes. Algunos péptidos contienen sólo unas pocas unidades de aminoácidos. Los péptidos cortos, por ejemplo, que tienen menos de diez unidades de aminoácidos, se denominan en ocasiones “oligopéptidos”. Otros péptidos contienen una gran cantidad de restos de aminoácidos, por ejemplo, hasta 100 o más, y se denominan “polipéptidos”. Por convencionalismo, un “polipéptido” puede considerarse como cualquiera cadena peptídica que contiene tres o más aminoácidos, mientras que normalmente un “oligopéptido” se considera como un tipo especial de polipéptido “corto”. Por tanto, según se usa en este documento, se entiende que cualquier referencia a un “polipéptido” también incluye a un oligopéptido. Además, cualquier referencia a un “péptido” incluye polipéptidos, oligopéptidos y proteínas. Cada disposición diferente de aminoácidos da lugar a polipéptidos o proteínas diferentes. El número de polipéptidos (y, por tanto, el número de proteínas diferentes) que pueden formarse es prácticamente ilimitado.

La expresión “inmunogenicidad menor o reducida” usada anteriormente y a continuación, es una expresión relativa y se refiere a la inmunogenicidad de la molécula fuente original respectiva cuando se expone *in vivo* al mismo de tipo de especie en comparación con la molécula modificada según la invención. La expresión “proteína modificada”, como se usa según esta invención, describe una proteína que tiene un número reducido de epítopes de células T y, por tanto, induce una inmunogenicidad reducida con respecto a la proteína parental cuando se expone al sistema inmune de una especie determinada. La expresión “proteína no modificada” como se usa en esta invención, describe la proteína “parental” en comparación con la “proteína modificada” y tiene un número mayor de epítopes de células T y, por tanto, una inmunogenicidad aumentada con respecto a la proteína modificada cuando se expone al sistema inmune de una especie determinada.

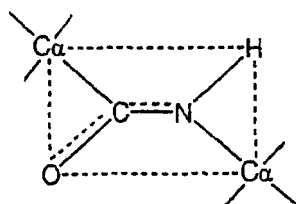
El “carbono alfa ( $\alpha$ )” es el átomo de carbono del componente carbono-hidrógeno (CH) que está en la cadena peptídica. Una “cadena lateral” es un grupo colgante del  $\alpha$  que puede comprender un grupo o resto sencillo o complejo, con dimensiones físicas que pueden variar significativamente en comparación con las dimensiones del péptido.

Pueden identificarse epítopes de células T mediante el método por ordenador de la presente invención al considerar restos de aminoácidos importantes para la unión de un epítopo de células T en particular a las moléculas MHC de clase II. Una vez identificados, pueden eliminarse o anularse los posibles epítopes de células T de una secuencia de restos de aminoácidos mediante la alteración, por ejemplo mutación, de restos aminoacídicos clave en esa secuencia. Cualquier modificación realizada en la secuencia de un péptido en una región que probablemente contiene epítopes de células T, mediante delección, adición o sustitución, dando lugar a una puntuación de unión global relativamente menor tendrá el efecto de dar lugar a una secuencia de restos de aminoácidos menos inmunogénica. En algunas circunstancias, puede ser deseable potenciar la unión de determinados péptidos a moléculas MHC de clase II. Por ejemplo, se ha propuesto que puede restablecerse la tolerancia a determinados autoantígenos en individuos que padecen una enfermedad auto-inmune si estos individuos se tratan con péptidos análogos de regiones del autoantígeno que se sabe que contienen epítopes de células T. Normalmente, el epítopo natural tiene una afinidad moderada por las moléculas MHC de clase II, mientras que el péptido análogo se produce de manera que tenga una afinidad relativamente mayor por las moléculas MHC de clase II. Esta alta afinidad es importante para estimular la vigilancia inmunológica para eliminar las células T que presentan este epítopo de alta afinidad o para que estas células sufran anergia. Esta modificación de un epítopo de células T también puede tener lugar a nivel proteico del péptido y la proteína completa se administra como agente terapéutico. Existen diversos factores que tienen funciones importantes en la determinación de la estructura total de

una proteína o un polipéptido. En primer lugar, el enlace peptídico, es decir, aquel enlace que une los aminoácidos entre sí en la cadena, es un enlace covalente. Este enlace es de estructura planar, esencialmente una amida sustituida. Una “amida” es cualquiera compuesto de un grupo de compuestos orgánicos que contiene el grupo:



El enlace peptídico planar que une  $\text{C}\alpha$  de aminoácidos adyacentes puede representarse como se muestra a continuación:



Puesto que los átomos  $\text{O}=\text{C}$  y  $\text{C}-\text{N}$  están en un plano relativamente rígido, no se produce una rotación libre alrededor de estos ejes. Por tanto, el plano representado esquemáticamente por la línea discontinua se denomina en ocasiones plano “amida” o “plano peptídico”, en el que están los átomos de oxígeno (O), carbono (C), nitrógeno (N) e hidrógeno (H) de la cadena principal peptídica. En las esquinas opuestas de este plano amida se localizan los átomos  $\text{C}\alpha$ . Puesto que sustancialmente no hay rotación alrededor de los átomos  $\text{O}=\text{C}$  y  $\text{C}-\text{N}$  en el plano peptídico o amida, una cadena polipeptídica comprende, por tanto, una serie de enlaces peptídicos planos que unen los átomos  $\text{C}\alpha$ .

Un segundo factor que tiene una función importante para definir la estructura o conformación total de un polipéptido o proteína es el ángulo de rotación de cada plano amida alrededor del enlace común  $\text{C}\alpha$ . Las expresiones “ángulo de rotación” y “ángulo de torsión” se consideran, a partir de ahora en este documento, expresiones equivalentes. Suponiendo que los átomos O, C, N y H permanecen en el plano amida (que normalmente es una suposición válida, aunque puede haber ligeras desviaciones de la planaridad de estos átomos en algunas conformaciones), estos ángulos de rotación definen las conformaciones de la cadena principal de los polipéptidos N y R, es decir, la estructura tal como se encuentra entre restos adyacentes. Estos dos ángulos se conocen como  $\phi$  y  $\psi$ . El conjunto de los ángulos  $\phi_i$  y  $\psi_i$ , donde el subíndice  $i$  representa un resto en particular de una cadena polipeptídica, define, por tanto, de forma eficaz el polipéptido.

En la literatura se definen los convencionalismos usados para definir los ángulos  $\phi$  y  $\psi$ , es decir, los puntos de referencia en los que los planos amida forman un ángulo de cero grados y la definición de cuál es ángulo  $\phi$  y cual es  $\psi$  para un polipéptido determinado. Véase, por ejemplo, Ramachandran y col., *Adv. Prot. Chem.* 23:283-437 (1968), en las páginas 285-94, que se incorporan a este documento por referencia.

El presente método puede aplicarse a cualquier proteína y se basa, en parte, en el descubrimiento de que en humanos la posición principal de anclaje del bolsillo 1 de los surcos de unión a la molécula MHC de clase II tiene una especificidad bien diseñada para cadenas laterales de aminoácidos en particular. La especificidad de este bolsillo se determina mediante la identidad del aminoácido en la posición 86 de la cadena beta de la molécula MHC de clase II. Este sitio se localiza en el fondo del bolsillo 1 y determina el tamaño de la cadena lateral que puede acomodarse en este bolsillo (Marshall, K.W., (1994), *J. Immunol.*, 152:4946-4956). Si este resto es una glicina, entonces todos los aminoácidos hidrófobos alifáticos y aromáticos (siendo los hidrófobos alifáticos: valina, leucina, isoleucina y metionina, y siendo los aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano) pueden acomodarse en el bolsillo, dándose preferencia a las cadenas laterales aromáticas. Si este resto del bolsillo es una valina, entonces la cadena lateral de este aminoácido se proyecta dentro de la bolsa y restringe el tamaño de las cadenas laterales peptídicas que pueden acomodarse de modo que sólo lo hagan las cadenas laterales hidrófobas alifáticas. Por tanto, en una secuencia de restos de aminoácidos, independientemente de si se encuentra un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba alifática o aromática, existe la posibilidad de que se presente un epítipo de células T restringido a una molécula MHC de clase II. Sin embargo, si la cadena lateral es hidrófoba alifática es aproximadamente dos veces más probable que esté asociada con un epítipo de células T que si fuera una cadena lateral aromática (suponiendo una distribución aproximadamente uniforme de los tipos de bolsillo 1 en la población global).

Un método por ordenador que supone una realización de la presente invención define la probabilidad de regiones peptídicas de contener epítopes de células T como sigue:

(1) Se analiza la secuencia primaria de un segmento peptídico de longitud predeterminada y se identifican todas las cadenas laterales hidrófobas alifáticas y aromáticas. (2) Se asigna a las cadenas laterales hidrófobas alifáticas un

valor mayor que a las cadenas laterales aromáticas, preferiblemente aproximadamente dos veces el valor asignado a las cadenas laterales aromáticas, por ejemplo, un valor de 2 para una cadena lateral hidrófoba alifática y un valor de 1 a una cadena lateral aromática. (3) Se suman los valores determinados que se presentan para cada segmento de restos de aminoácidos solapantes (ventana) de longitud uniforme predeterminada dentro del péptido y se asigna el valor total a un segmento en particular (ventana) a un único resto de aminoácido en una posición intermedia del segmento (ventana), preferiblemente a un resto situado aproximadamente en el punto medio del segmento muestreado (ventana). Este procedimiento se repite para cada segmento de restos de aminoácidos solapantes muestreados (ventana). Por tanto, se asigna a cada resto de aminoácido del péptido un valor que hace referencia a la probabilidad de que se presente un epítipo de células T en este segmento en particular (ventana). (4) Los valores calculados y asignados como se describe en la etapa 3, anteriormente, pueden representarse frente a las coordenadas de aminoácidos de la secuencia completa de restos de aminoácidos que se está evaluando. (5) Se considera que todas las porciones de la secuencia que tienen una puntuación de un valor predeterminado, por ejemplo, un valor de 1, probablemente contienen un epítipo de células T y pueden modificarse, si se desea.

Este aspecto particular de la presente invención proporciona un método general mediante el cual pueden describirse las regiones de péptidos que probablemente contienen epítopos de células T. Las modificaciones del péptido en estas regiones tienen la posibilidad de modificar las características de unión a MHC de clase II. De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, pueden predecirse epítopos de células T con mayor precisión mediante el uso de un método por ordenador más sofisticado que tiene en cuenta las interacciones de los péptidos con modelos de alelos MHC de clase II.

La predicción por ordenador de epítopos de células T presentes en un péptido de acuerdo con este aspecto particular contempla la construcción de modelos de al menos 42 alelos MHC de clase II en base a las estructuras de todas las moléculas MHC de clase II conocidas y un método para el uso de estos modelos en la identificación por ordenador de epítopos de células T, la construcción de bibliotecas de cadenas principales peptídicas para cada modelo que permitan obtener la variabilidad conocida en las posiciones relativas del carbono alfa ( $C\alpha$ ) del esqueleto peptídico, la construcción de bibliotecas de conformaciones de cadenas laterales de aminoácidos para cada punto de anclaje del esqueleto con cada modelo para cada uno de los 20 aminoácidos alternativos en las posiciones críticas de interacción entre el péptido y la molécula MHC de clase II y el uso de estas bibliotecas de esqueletos peptídicos y conformaciones de cadenas laterales junto con una función de valoración para seleccionar el esqueleto y la conformación de cadena lateral óptimos para un péptido particular acoplado con una molécula MHC de clase II en particular y la obtención de un valor de unión a partir de esta interacción.

Los modelos de moléculas MHC de clase II puede obtenerse mediante el modelado por homología a partir de varias estructuras similares que se encuentran en el banco de datos de proteínas ("PBD") de Brookhaven. Esto puede hacerse usando un software de modelado por homología semiautomático (Modeller, Sali A. y Blundell T.L., 1993, *J. Mol Biol* 234: 779-815) que incorpora una función de hibridación simulada junto con el campo de fuerzas CHARMM para la minimización de la energía (disponible en Molecular Simulations Inc., San Diego, Ca.). También pueden utilizarse métodos de modelado alternativos.

El presente método difiere significativamente de otros métodos por ordenador que utilizan bibliotecas de datos de unión obtenidos experimentalmente para cada aminoácido alternativo en cada posición del surco de unión para un pequeño conjunto de moléculas MHC de clase II (Marshall, K.W., y col., *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids*, 1(3): 157-162) (1995) o incluso otros métodos por ordenador que utilizan datos de unión experimentales similares para definir las características de unión de tipos particulares de bolsillos de unión dentro del surco, usando de nuevo un subconjunto relativamente pequeño de moléculas MHC de clase II, y después "mezclando y emparejando" los tipos de bolsillo de esta biblioteca de bolsillo para crear artificialmente moléculas MHC de clase II "virtuales" adicionales (Sturniolo T., y col., *Nat. Biotech.*, 17(6): 555-561 (1999)). Ambos métodos previos presentan la principal desventaja de que, debido a la complejidad de los ensayos y a la necesidad de sintetizar grandes cantidades de variantes peptídicas, sólo pueden analizarse a nivel experimental un pequeño número de moléculas MHC de clase II. Por tanto, el primer método anterior permite sólo hacer predicciones para un pequeño número de moléculas MHC de clase II. El segundo método anterior también parte de la suposición de que un bolsillo revestido con aminoácidos similares en una molécula tendrá las mismas características de unión cuando esté en el contexto de un alelo de Clase II diferente y presenta desventajas adicionales porque solamente pueden crearse "virtualmente" aquellas moléculas MHC de clase II que contengan bolsillos incluidos en la biblioteca de bolsillos. Usando la estrategia de modelado descrito en este documento puede deducirse la estructura de cualquier número y tipo de moléculas MHC de clase II, por tanto pueden seleccionarse específicamente alelos que sean representativos de la población global. Además, puede aumentarse el número de moléculas MHC de clase II analizadas creando modelos adicionales en lugar de tener que generar datos adicionales mediante experimentación compleja.

El uso de una biblioteca de cadenas principales permite la variación en las posiciones de los átomos  $C\alpha$  de los diversos péptidos que se están analizando cuando se acoplan con moléculas MHC de clase II particulares. Esto contrasta una vez más con los métodos por ordenador previos alternativos descritos anteriormente que dependen del uso de cadenas principales peptídicas simplificadas para el análisis de la unión de los aminoácidos en bolsillos particulares. Probablemente estas cadenas principales simplificadas no son representativas de conformaciones esqueletos encontrados en péptidos "reales", lo que lleva a imprecisiones en la predicción de la unión del péptido. La presente biblioteca de cadenas principales se constituye superponiendo los esqueletos de todos los péptidos unidos a moléculas MHC de clase II encontrados en el banco de datos de proteínas y anotando la desviación de la media cuadrática (RMS, por

sus siglas en inglés) entre los átomos  $C\alpha$  de cada uno de los once aminoácidos localizados dentro del surco de unión. Aunque esta biblioteca puede obtenerse a partir de un número pequeño de estructuras murinas y humanas disponibles adecuadas (actualmente 13), con el fin de permitir la posibilidad de una variabilidad aún mayor, la cifra de la RMS para cada posición  $C''-\alpha$  se aumenta en un 50%. A continuación se determina la posición  $C\alpha$  promedio de cada aminoácido y se traza una esfera alrededor de este punto cuyo radio es igual a la desviación de RMS en esta posición más el 50%. Esta esfera representa todas las posiciones de  $C\alpha$  permitidas.

Trabajando a partir del  $C\alpha$  con la desviación RMS mínima (la del aminoácido en el bolsillo 1 como se mencionó anteriormente, equivalente a la posición 2 de los 11 restos en el surco de unión), la esfera se cuadrícula tridimensionalmente, y cada vértice dentro de la cuadrícula se usa a continuación como una posible localización para un  $C\alpha$  de ese aminoácido. El plano amida posterior, correspondiente al enlace peptídico con el aminoácido siguiente se inserta en cada uno de estos  $C\alpha$  y los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  se rotan paso a paso a intervalos establecidos con el fin de colocar el  $C\alpha$  posterior. Si el  $C\alpha$  posterior está dentro de la “esfera de posiciones permitidas” para este  $C\alpha$  entonces se acepta la orientación del dipéptido, mientras que si está fuera de la esfera, entonces se rechaza el dipéptido. A continuación se repite este proceso para cada una de las posiciones de  $C\alpha$  posteriores, de modo que el péptido crece a partir de la “semilla” del  $C\alpha$  del bolsillo 1 hasta que se han colocado los nueve  $C\alpha$  posteriores a partir de todas las permutaciones posibles de los  $C\alpha$  precedentes. Después, el proceso se repite una vez más para el único  $C\alpha$  que precede al bolsillo 1 para crear una biblioteca de posiciones  $C\alpha$  de la cadena principal localizadas en el surco de unión.

El número de cadenas principales generadas depende de varios factores: el tamaño de las “esferas de posiciones permitidas”; la precisión del entramado de la “esfera principal” en la posición del bolsillo 1 y a precisión de la rotación paso a paso de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  usados para ubicar los  $C\alpha$  posteriores. Mediante el uso de este procedimiento, se pueden crear una biblioteca grande de cadenas principales. Cuanto mayor es la biblioteca de cadenas principales, mayor es la probabilidad de que se encuentre el ajuste óptimo para un péptido en particular dentro del surco de unión de una molécula MHC de clase II. Puesto que todas las cadenas principales no serán adecuadas para acoplarse a todos los modelos de moléculas MHC de clase II debido a impedimentos estéricos con aminoácidos de los dominios de unión, se crea en la biblioteca un subconjunto para cada alelo que comprende cadenas principales que pueden acomodarse a ese alelo. El uso de la biblioteca de cadenas principales, junto con los modelos de moléculas MHC de clase II crea una base de datos completa que consta de conformaciones de cadenas laterales permitidas para cada aminoácido en cada posición del surco de unión para cada molécula MHC de clase II acoplada con esqueleto permitido. Este conjunto de datos se genera usando una función de solapamiento estérico simple donde se acopla una molécula MHC de clase II con una cadena principal y se inserta una cadena lateral de aminoácidos en el esqueleto en la posición deseada. Cada uno de los enlaces rotatorios de la cadena lateral se rota paso a paso a intervalos establecidos y se anotan las posiciones resultantes de los átomos que dependen de ese enlace. Se indica la interacción del átomo con átomos de las cadenas laterales del surco de unión y se aceptan o rechazan las posiciones de acuerdo con los siguientes criterios: la suma total del solapamiento de todos los átomos colocados hasta el momento no debe exceder de un valor predeterminado. De este modo, la rigurosidad de la consulta conformacional es una función del intervalo usado en la rotación paso a paso del enlace y el límite predeterminado para el solapamiento total. Este último valor puede ser pequeño si se sabe que un bolsillo en particular es rígido, sin embargo, la rigurosidad puede relajarse si se sabe que las posiciones de las cadenas laterales del bolsillo son relativamente flexibles. Por tanto, pueden hacerse concesiones para imitar las variaciones en la flexibilidad dentro de los bolsillos del surco de unión. Esta consulta conformacional se repite a continuación para cada aminoácido en cada posición de cada cadena principal cuando se acopla con cada una de las moléculas MHC de clase II para crear la base de datos completos de conformaciones de cadenas laterales.

Se usa una expresión matemática adecuada para estimar la energía de unión de los modelos de moléculas MHC de clase II junto con las conformaciones de ligandos peptídicos que se derivan empíricamente analizando la gran base de datos de cadenas principales/conformaciones de cadenas laterales descritas anteriormente. De este modo, se analiza la presencia de posibles epítopes de células T en una proteína sometiendo a cada posible péptido de longitud variable entre 9 y 20 aminoácidos (aunque la longitud se mantiene constante para cada análisis) a los siguientes cálculos: se selecciona una molécula MHC de clase II junto con una cadena principal peptídica permitida para esa molécula y se insertan las cadenas laterales correspondientes en la secuencia peptídica deseada. Se registran la identidad atómica y los datos de la distancia interatómica relacionados con una cadena lateral en particular en una posición particular en la cadena principal para cada conformación permitida de ese aminoácido (obtenido a partir de la base de datos descrita anteriormente). Esto se repite para cada cadena lateral a lo largo de la cadena principal y se obtienen las puntuaciones del péptido usando una función de puntuación. Se conserva la mejor puntuación para esa cadena principal peptídica y el proceso se repite para cada esqueleto permitido según el modelo seleccionado. Se comparan las puntuaciones de todas las cadenas principales permitidas y se considera que la puntuación más alta es la puntuación del péptido para el péptido deseado en ese modelo de MHC de clase II. A continuación, este proceso se repite para cada modelo con cada péptido posible derivado de la proteína que se está analizando y se representan los valores de los péptidos frente a los modelos.

En el contexto de la presente invención, cada ligando que se presenta para el cálculo de la afinidad de unión es un segmento de aminoácidos seleccionado entre un péptido o una proteína como se ha descrito anteriormente. Por tanto, el ligando es una extensión de aminoácidos seleccionada de una longitud de aproximadamente 9 a 20 aminoácidos derivada de un péptido, polipéptido o proteína de secuencia conocida. Los términos “aminoácidos” y “restos” se consideran a partir de ahora en este documento como términos equivalentes. El ligando, en forma de aminoácidos consecutivos del péptido que se va a examinar insertados en una cadena principal de la biblioteca de cadenas principales peptídicas, se coloca en la hendidura de unión de una molécula MHC de clase II de la biblioteca

de modelos de moléculas MHC de clase II mediante las coordenadas de los átomos C $\alpha$  del esqueleto peptídico y se selecciona una conformación permitida para cada cadena lateral entre la base de datos de conformaciones permitidas. Las identidades atómicas y distancias interatómicas pertinentes también se recuperan de esta base de datos y se usan para calcular la puntuación de unión del péptido. Los ligandos con una elevada afinidad de unión por el bolsillo de unión de MHC de clase II se marcan como candidatos para mutagénesis dirigida a sitio. Se hacen sustituciones de aminoácidos en el ligando marcado (y, por tanto, en la proteína de interés) que después se prueban de nuevo usando la función de puntuación para determinar cambios que reducen la afinidad de unión por debajo de un valor umbral predeterminado. A continuación estos cambios pueden incorporarse a la proteína de interés para eliminar epítopes de células T. La unión entre el ligando peptídico y el surco de unión de las moléculas MHC de clase II implica interacciones no covalentes que incluyen, aunque sin limitación: puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas (lipófilas) y fuerzas de Van der Waal. Estas se incluyen en la función de puntuación del péptido como se describe con detalle a continuación. Debe entenderse que un puente de hidrógeno es un enlace no covalente que puede formarse entre grupos polares o cargados y consta de un átomo de hidrógeno compartido por otros dos átomos. El hidrógeno del donador de hidrógeno tiene una carga positiva donde el aceptor de hidrógeno tiene una carga negativa parcial. Para los propósitos de las interacciones péptido/proteína, los donadores del puente de hidrógeno pueden ser nitrógenos con hidrógeno unido o hidrógenos unidos a oxígeno o nitrógeno. Los átomos del aceptor de puentes de hidrógeno pueden ser oxígenos no unidos a hidrógeno, nitrógenos sin hidrógenos unidos y una o dos conexiones, o azufres con solamente una conexión. Ciertos átomos, tales como oxígenos unidos a hidrógenos o nitrógenos de imina (por ejemplo, C=NH) pueden ser tanto aceptores como donadores de hidrógeno. Las energías del puente de hidrógeno varían de 3 a 7 Kcal/mol y son mucho más fuertes que las fuerzas de Van der Waal, pero más débiles que los enlaces covalentes. Los puentes de hidrógeno también son muy orientables y son más fuertes cuando el átomo donador, el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor son colineales. Los enlaces electrostáticos se forman entre pares iónicos opuestamente cargados y la fuerza de la interacción es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre los átomos de acuerdo con la ley de Coulomb. La distancia óptima entre pares iónicos es de aproximadamente 2,8 Å. En interacciones proteína/péptido, pueden formarse enlaces electrostáticos entre arginina, histidina o lisina y aspartato o glutamato. La fuerza del enlace dependerá del pKa del grupo ionizante y de la constante dieléctrica del medio aunque son aproximadamente similares en fuerza a los puentes de hidrógeno.

Las interacciones lipófilas suponen contactos hidrófobo-hidrófobo favorables que tienen lugar entre la proteína y el ligando peptídico. Normalmente, éstas se darán entre cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos del péptido enterrados en los bolsillos del surco de unión, de modo que no estén expuestos al solvente. La exposición de los restos hidrófobos al solvente es muy desfavorable ya que las moléculas circundantes de solvente se ven obligadas a formar puentes de hidrógeno entre sí dando lugar a estructuras de clatrato en forma de jaula. La disminución resultante en la entropía es altamente desfavorable. Los átomos lipófilos pueden ser azufres que no son polares ni aceptores de hidrógeno y átomos de carbono que no son polares.

Los enlaces de Van der Waal son fuerzas inespecíficas que aparecen entre átomos que están alejados de 3 a 4 Å. Son más débiles y menos específicos que los puentes de hidrógeno y los enlaces electrostáticos. La distribución de la carga electrónica alrededor de un átomo cambia con el tiempo y, en un instante, dicha distribución de la carga pasa a no ser simétrica. Esta asimetría transitoria en la carga electrónica induce una asimetría similar en los átomos vecinos. Las fuerzas de atracción resultantes entre los átomos alcanzan un máximo a la distancia de contacto de Van der Waal pero disminuye muy rápidamente a aproximadamente 1 Å a aproximadamente 2 Å. En cambio, cuando los átomos están separados por una distancia menor a la distancia de contacto, las fuerzas de repulsión cada vez más fuertes llegan a ser dominantes ya que se solapan las nubes electrónicas externas de los átomos. Aunque las fuerzas de atracción son relativamente débiles en comparación con los enlaces electrostáticos y los puentes de hidrógeno (aproximadamente 0,6 Kcal/mol), las fuerzas de repulsión en particular pueden ser muy importantes para determinar si un ligando peptídico puede unirse satisfactoriamente a una proteína.

En una realización, la función de puntuación de Böhm (enfoque SCORE1) se usa para estimar la constante de unión (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 8(3):243-256 (1994) que se incorpora por la presente en su totalidad). En otra realización, la función de puntuación (enfoque SCORE2) se usa para estimar las afinidades de unión como indicador de un ligando que contiene un epítopo de células T (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 12(4):309-323 (1998) que se incorpora por la presente en su totalidad). Sin embargo, las funciones de puntuación de Böhm que se describen en las referencias anteriores se usan para estimar la afinidad de unión de un ligando a una proteína cuando ya se sabe que el ligando se une satisfactoriamente a la proteína y se ha resuelto la estructura del complejo proteína/ligando, estando presente la estructura resuelta en el banco de datos de proteínas ("BDP").

Por tanto, la función de puntuación se ha desarrollado aprovechando los datos de unión positiva conocidos. Para permitir la discriminación entre enlazadores positivos y negativos, debe añadirse opcionalmente un término de repulsión a la ecuación. Además, se consigue una estimación más satisfactoria de la energía de unión calculando las interacciones lipófilas por pares en lugar de usar el término de energía basado en el área de las funciones de Böhm anteriores. Por tanto, en una realización preferida, la energía de unión se estima usando una función de puntuación de Böhm modificada. En la función de puntuación de Böhm modificada, la energía de unión entre la proteína y el ligando ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) se estima considerando los siguientes parámetros: la reducción de la energía de unión debida a la pérdida global de entropía de traslación y rotación del ligando ( $\Delta G_0$ ); las contribuciones de los puentes de hidrógeno ideales ( $\Delta G_{\text{hb}}$ ) donde al menos un miembro del par es neutro; las contribuciones de interacciones iónicas no perturbadas ( $\Delta G_{\text{iónica}}$ ); las interacciones lipófilas entre átomos de ligandos lipófilos y átomos del aceptor lipófilo ( $\Delta G_{\text{lipo}}$ ); la

pérdida de energía de unión debida a la congelación de los grados de libertad internos del ligando, es decir, la libertad de rotación alrededor de cada enlace C-C es reducida ( $\Delta G_{\text{rot}}$ ); la energía de la interacción entre la proteína y el ligando ( $E_{\text{vdw}}$ ). La consideración de estos términos da lugar a la *ecuación 1*:

$$(\Delta G_{\text{unión}}) = (\Delta G_0) + (\Delta G_{\text{hb}} \times N_{\text{hb}}) + (\Delta G_{\text{iónica}} \times N_{\text{iónica}}) + (\Delta G_{\text{lipo}} \times N_{\text{lipo}}) + (\Delta G_{\text{rot}} + N_{\text{rot}}) + (E_{\text{vdw}}).$$

Donde N es el número de interacciones aceptables para un término específico de la ecuación y, en una realización,  $\Delta G_0$ ,  $\Delta G_{\text{hb}}$ ,  $\Delta G_{\text{iónica}}$ ,  $\Delta G_{\text{lipo}}$  y  $\Delta G_{\text{rot}}$  son constantes que tienen los valores: 5,4, -4,7, -4,7, -0,17 y 1,4, respectivamente.

El término  $N_{\text{hb}}$  se calcula de acuerdo con la *ecuación 2*:

$$N_{\text{hb}} = \sum_{\text{enlaces-h}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \times f(N_{\text{adyac}}) \times f_{\text{pcs}}$$

$f(\Delta R, \Delta \alpha)$  es una función de penalización que representa desviaciones grandes de los puentes de hidrógeno de condiciones ideales y se calcula de acuerdo con la *ecuación 3*:

$$f(\Delta R, \Delta \alpha) = f_1(\Delta R) \times f_2(\Delta \alpha)$$

$$\begin{aligned} \text{donde:} \quad f_1(\Delta R) &= 1 \text{ si } \Delta R \leq \text{TOL} \\ &= 1 - (\Delta R - \text{TOL})/0,4 \text{ si } \Delta R \leq 0,4 + \text{TOL} \\ &= 0 \text{ si } \Delta R > 0,4 + \text{TOL} \\ \text{y:} \quad f_2(\Delta \alpha) &= 1 \text{ si } \Delta \alpha < 30^\circ \\ &= 1 - (\Delta \alpha - 30)/50 \text{ si } \Delta \alpha \leq 80^\circ \\ &= 0 \text{ si } \Delta \alpha > 80^\circ \end{aligned}$$

TOL es la desviación tolerada de la longitud del puente de hidrógeno = 0,25 Å.

$\Delta R$  es la desviación de la longitud del puente de hidrógeno H-O/N del valor ideal = 1,9 Å.

$\Delta \alpha$  es la desviación del ángulo del puente de hidrógeno  $\angle_{\text{N/O-H...O/N}}$  de su valor ideal de 180°.

$f(N_{\text{adyac}})$  distingue entre partes cóncavas y convexas de una superficie proteica y, por tanto, asigna mayor peso a las interacciones polares encontradas en bolsillos que a las que aparecen en la superficie proteica.

Esta función se calcula de acuerdo con la *ecuación 4* siguiente:

$$f(N_{\text{adyac}}) = (N_{\text{adyac}}/N_{\text{adyac},0})^\alpha \text{ donde } \alpha = 0,5$$

$N_{\text{adyac}}$  es el número de átomos de la proteína que no son hidrógeno que están más cerca de 5 Å de cualquier átomo dado de la proteína.

$N_{\text{adyac},0}$  es una constante = 25

$f_{\text{pcs}}$  es una función que considera el área de superficie de contacto polar por puente de hidrógeno y, por lo tanto, distingue entre puentes de hidrógeno fuertes y débiles y su valor se determina de acuerdo con los siguientes criterios:

$$\begin{aligned} f_{\text{pcs}} &= \beta \text{ cuando } A_{\text{polar}}/N_{\text{HB}} < 10 \text{ Å}^2 \\ \text{o } f_{\text{pcs}} &= 1 \text{ cuando } A_{\text{polar}}/N_{\text{HB}} > 10 \text{ Å}^2 \end{aligned}$$

$A_{\text{polar}}$  es el tamaño de la superficie de contacto proteína -ligando polar.

$N_{\text{HB}}$  es el número de puentes de hidrógeno

$\beta$  es una constante cuyo valor = 1,2

## ES 2 309 167 T3

Para la aplicación de la función de puntuación de Böhm modificada, se calculan las contribuciones de las interacciones iónicas,  $\Delta G_{\text{iónica}}$ , de un modo similar al descrito anteriormente para los puentes de hidrógeno ya que se supone la misma dependencia geométrica.

El término  $N_{\text{lipo}}$  se calcula de acuerdo con la ecuación 5 siguiente:

$$N_{\text{lipo}} = \sum_{\text{IL}} f(r_{\text{IL}})$$

$f(r_{\text{IL}})$  se calcula para todos los átomos de ligandos lipófilos, I, y todos los átomos de la proteína lipófilas, L, de acuerdo con los siguientes criterios:

$f(r_{\text{IL}}) = 1$  cuando  $r_{\text{IL}} \leq R1$   $f(r_{\text{IL}}) = (r_{\text{IL}} - R1)/(R2 - R1)$  cuando  $R2 < r_{\text{IL}} < R1$

$f(r_{\text{IL}}) = 0$  cuando  $r_{\text{IL}} \geq R2$

donde:  $R1 = r_1^{\text{vdw}} + r_L^{\text{vdw}} + 0,5$

$R2 = R1 + 3,0$

$r_1^{\text{vdw}}$  es el radio de Van der Waal del átomo I

y  $r_L^{\text{vdw}}$  es el radio de Van der Waal del átomo L.

El término  $N_{\text{rot}}$  es el número de enlaces rotatorios de la cadena lateral del aminoácido y se acepta que es el número de enlaces  $sp^3 - sp^3$  y  $sp^3 - sp^2$  acíclicos. Las rotaciones de  $-CH_3$  o  $-NH_3$  terminales no se tienen en cuenta.

El término final,  $E_{\text{vdw}}$ , se calcula de acuerdo con la ecuación 6 siguiente:

$$E_{\text{vdw}} = \epsilon_1 \epsilon_2 ((r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}})^{12}/r^{12} - (r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}})^6/r^6),$$

donde:

$\epsilon_1$  y  $\epsilon_2$  son constantes dependientes de la identidad atómica

$r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}}$  son los radios atómicos de Van der Waal

$r$  es la distancia entre un par de átomos.

Con respecto a la ecuación 6, en una realización, las constantes  $\epsilon_1$  y  $\epsilon_2$  tiene los valores atómicos: C: 0,245; N: 0,283; O: 0,316; S: 0,316, respectivamente (es decir, para átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, respectivamente). Con respecto a las ecuaciones 5 y 6, a los radios de Van der Waal se les asigna los valores atómicos C: 1,85; N: 1,75; O: 1,60; S: 2,00 Å.

Debe entenderse que todos los valores predeterminados y constantes que se dan en las ecuaciones anteriores se determinan dentro de las limitaciones del conocimiento actual de las interacciones proteína-ligando en particular con respecto al tipo de cálculo que se está llevando a cabo en este documento. Por tanto, es posible que, conforme se mejore adicionalmente esta función de puntuación, puedan cambiar estos valores y constantes por lo que puede usarse cualquier valor numérico adecuado que ofrezca los resultados deseados en términos de estimación de la energía de unión de una proteína a un ligando y, por tanto, están dentro del alcance de la presente invención.

Como se ha descrito anteriormente, la función de puntuación se aplica a datos extraídos de la base de datos de conformaciones de cadenas laterales, identidades atómicas y distancias interatómicas. A los fines de la presente descripción, el número de moléculas MHC de clase II incluidas en esta base de datos es de 42 modelos más cuatro estructuras resueltas. Debe ser evidente a partir de las anteriores descripciones que la naturaleza modular de la construcción del método por ordenador de la presente invención significa que los nuevos modelos pueden simplemente añadirse y analizarse con la biblioteca de cadenas principales peptídicas y la función de consulta conformacional de cadena lateral para crear conjuntos de datos adicionales que puedan ser procesados mediante la función de puntuación de péptidos como se ha descrito anteriormente. Esto permite que el repertorio de moléculas MHC de clase II analizadas aumente fácilmente, o que se replacen estructuras y datos asociados si se dispone de datos que permitan crear modelos más precisos de los alelos existentes.

Debe entenderse que, aunque la función de puntuación anterior es relativamente simple en comparación con algunas metodologías sofisticadas disponibles, los cálculos se realizan de forma extremadamente rápida. También debe entenderse que el objetivo no es calcular la energía de unión verdadera *per se* para cada péptido acoplado en el surco de unión de una proteína MHC de clase II seleccionada. El objetivo subyacente es obtener datos de energía de unión comparativos como ayuda para predecir la localización de epítopes de células T en base a la estructura primaria (es

decir, la secuencia de aminoácidos) de una proteína seleccionada. Una energía de unión relativamente elevada o una energía de unión por encima de un valor umbral seleccionado sugeriría la presencia de un epítipo de células T en el ligando. A continuación, el ligando puede someterse a al menos una ronda de sustitución de aminoácidos, tras lo cual se recalcula la energía de unión. Debido a la naturaleza rápida de los cálculos, estas manipulaciones de la secuencia peptídica pueden realizarse de forma interactiva en la interfaz del usuario del programa en un hardware informático disponible rentable. Por tanto no se requiere una inversión grande en hardware informático.

Sería evidente para un experto en la materia que podría usarse otro software disponible con el mismo propósito. En particular, puede usarse un software más sofisticado que sea capaz de acoplar ligandos en sitios de unión de proteínas junto con una reducción al mínimo de la energía. Los ejemplos de software de acoplamiento son: DOCK (Kuntz y col., *J. Mol. Biol.*, 161: 269-288 (1982)), LUDI (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 8:623-632 (1994)) y FLEXX (Rarey M., y col., *ISMB*, 3: 300-308 (1995)). Los ejemplos de software de modelado y manipulación molecular son: AMBER (Tripos) y CHARMM (Molecular Simulations Inc.) El uso de estos métodos por ordenador limitaría en gran medida el rendimiento del método de esta invención debido a las extensiones de tiempo de procesamiento requeridas para hacer los cálculos necesarios. Sin embargo, es factible que estos métodos puedan usarse como un “filtro secundario” para obtener cálculos más precisos de la energía de unión en aquellos péptidos que se encuentre que son “enlazadores positivos” mediante el método de la presente invención.

La limitación del tiempo de procesamiento para cálculos sofisticados de mecánica molecular o dinámica molecular es aquella que se define tanto por el diseño del software que hace estos cálculos, como por las limitaciones tecnológicas actuales del hardware informático. Puede preverse que, en el futuro, con la escritura de un código más eficaz y los aumentos continuos en la velocidad de los procesadores informáticos, pueda llegar a ser factible hacer dichos cálculos dentro de un intervalo de tiempo más manejable. Puede encontrarse información adicional sobre funciones de energía aplicadas a macromoléculas y la consideración de las diversas interacciones que tienen lugar en una estructura proteica plegada en: Brooks, B.R., y col., *J. Comput. Chem.*, 4:187-217 (1983) y puede encontrarse información adicional referente a interacciones proteína-ligando generales en: Dauber-Osguthorpe y col., *Proteins* 4(1): 31-47 (1988), que se incorporan en este documento por referencia en su totalidad. También pueden encontrarse información general útil, por ejemplo, en Fasman, G.D., ed., *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Plenum Press, Nueva York, ISBN: 0-306 4313-9.

El presente método de predicción puede calibrarse frente a un conjunto de datos que comprende un gran número de péptidos cuya afinidad por varias moléculas de MHC de clase II ha sido determinada previamente a nivel experimental.

Según una realización preferida del método, cualquiera de los métodos de predicción específicos descritos en este documento, o cualquier otro método con base informática para predecir interacciones péptido-moléculas MHC de clase II que produce puntuaciones numéricas para cada par de péptido/MHC de clase II, se calibra frente a un conjunto de datos que comprende un gran número de péptidos cuya afinidad por varias moléculas MHC de clase II se ha determinado previamente de forma experimental. Comparando los datos calculados frente a los experimentales, puede determinarse un valor de corte por encima del cual se sabe que todos los epítopos de células T determinados experimentalmente se han predicho correctamente.

Específicamente, se calcula la puntuación numérica obtenida por ordenador para cada par péptido/MHC de clase II en el conjunto de datos. La puntuación se calcula de modo que una puntuación mayor representa un aumento de la probabilidad de unión. La puntuación obtenida por ordenador más baja para un par péptido/MHC de clase II que se encuentre unido experimentalmente se considera como puntuación límite. Todas las puntuaciones obtenidas por ordenador que estén significativamente por debajo de esta puntuación límite se considera que representan pares en los que no hay unión péptido/MHC de clase II, mientras que las puntuaciones obtenidas por ordenador por encima de la puntuación límite representan un posible par de unión péptido/MHC de clase II. En general, para un algoritmo de puntuación por ordenador determinado, habrá algunas combinaciones de péptido/MHC de clase II que obtendrán puntuaciones por encima de la puntuación límite pero que realmente no se une. Por tanto, esta realización preferida del método puede generar falsos positivos, pero nunca o sólo en muy raras ocasiones generará falsos negativos.

Esta realización basada en una puntuación límite del método es especialmente útil cuando el objetivo es eliminar, mediante mutación, la mayoría o todos los epítopos de células T de una proteína. Específicamente, según una realización más preferida del método de la invención, se eliminan la mayoría o todos los epítopos de células T de una proteína de la siguiente forma. Mediante un algoritmo por ordenador se analizan posibles epítopos de células T en la secuencia de la proteína. Cada posible epítipo de células T recibe una puntuación, con puntuaciones crecientes correlacionadas con la probabilidad mayor de unión a una molécula MHC de clase II. Cada segmento peptídico con una puntuación superior a la puntuación límite se muta de modo que la puntuación del segmento mutado será menor que la puntuación límite. Las mutaciones se eligen preferiblemente para que no reduzcan la actividad de la proteína por debajo de una actividad necesaria para un propósito determinado. Se diseña una proteína con mutaciones múltiples, que carece de la mayoría o todos los epítopos de células T predichos por ordenador. Dicha proteína con mutaciones múltiples se denomina “proteína desinmunizada”.

La proteína desinmunizada se sintetiza mediante métodos convencionales. Por ejemplo, una secuencia de ADN artificial que codifica la proteína desinmunizada se ensambla a partir de oligonucleótidos sintéticos, se liga a un vector de expresión y se une funcionalmente a elementos que promueven la expresión de la proteína desinmunizada. A continuación, la proteína desinmunizada se purifica mediante métodos convencionales. La proteína desinmunizada

resultantes contiene aminoácidos mutados, de modo que se eliminan los auténticos epítopes de células T. Además, la proteína desinmunizada contendrá a menudo aminoácidos mutados en segmentos que según la previsión de un algoritmo son epítopes de células T, pero que de hecho no son epítopes de células T. Sin embargo, consecuencias deletéreas significativas no dan lugar a mutaciones en los epítopes falsamente predichos, ya que las mutaciones se eligen para que tenga un efecto pequeño sobre la actividad de la proteína. Además, no se obtienen consecuencias deletéreas de la posible introducción de nuevos epítopes de células B dentro de una proteína, ya que la ausencia de epítopes de células T evita una respuesta de células B frente a la proteína modificada.

A continuación se ilustra a modo de ejemplos la aplicación de la metodología descrita anteriormente a diversos péptidos que pueden ser considerados para su desinmunización, mediante modificaciones para potenciar su unión a moléculas MHC de clase II con fines terapéuticos.

La invención puede aplicarse a cualquier molécula biológica que tenga una actividad biológica y/o farmacológica definida sustancialmente con las mismas secuencias primarias de aminoácidos que las que se describen en este documento y podría incluir, por ejemplo, moléculas obtenidas por métodos de ingeniería genética y otros procesos. La expresión “molécula biológica” se usa en este documento para moléculas que tiene una función biológica y producen un efecto o actividad biológica, farmacológica o farmacéutica. Preferiblemente, las moléculas biológicas según las invenciones son péptidos, polipéptidos y proteínas. En cuanto a las proteínas, se prefieren las inmunoglobulinas. La invención incluye también variantes y otras modificaciones de un polipéptido, proteína, proteína de fusión o inmunoglobulina específico que tiene en principio la misma actividad biológica y una inmunogenicidad (reducida) similar. Adicionalmente, se incluyen fragmentos de anticuerpos como sFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fc y fragmentos de proteínas biológicamente eficaces. Los anticuerpos de origen humano o los anticuerpos humanizados muestran *per se* una inmunogenicidad inferior o nula en humanos y no tienen o tienen un número menor de epítopes inmunogénicos en comparación con anticuerpos no humanos. Sin embargo, también existe la necesidad de desinmunización de estas moléculas puesto que se ha demostrado que algunas de ellas inducen una respuesta inmune significativa en humanos. Además, los antígenos que inducen una respuesta inmune no deseada y demasiado fuerte pueden modificarse según el método de la invención y obtenerse antígenos que tienen una inmunogenicidad reducida que es, sin embargo, suficientemente fuerte como para usar el antígeno, por ejemplo, como vacuna.

Algunas moléculas, como la leptina, como se ha identificado en otras fuentes de mamíferos, tienen en común muchas de las secuencias peptídicas de la presente descripción y que tienen en común muchas secuencias peptídicas sustancialmente con la misma secuencia que las que se incluyen en el listado descrito. Igualmente, por tanto, estas secuencias de proteínas entran dentro del alcance de la presente invención.

La invención se refiere a análogos de las moléculas biológicas según la invención en las que las sustituciones de al menos un resto de aminoácido se han realizado en posiciones que dan lugar a una reducción sustancial de la actividad o la eliminación de uno o más posibles epítopes de células T de la proteína.

Una o más sustituciones de aminoácidos en puntos particulares dentro de cualquiera de los posibles ligandos de las moléculas MHC de clase II en las tablas de los ejemplos pueden dar lugar a una molécula con su posible inmunogenicidad reducida cuando se administra como agente terapéutico al hospedador humano. Preferiblemente, se realizan sustituciones de aminoácidos en puntos adecuados dentro de la secuencia peptídica predicha para lograr una reducción sustancial o la eliminación de la actividad del epítipo de células T. En la práctica, un punto adecuado equivaldrá preferiblemente a un resto de aminoácido que se una dentro de uno de los bolsillos hidrófobos en el interior del surco de unión de la molécula MHC de clase II. También se considera, y está dentro del alcance de la presente invención, los restos de aminoácidos del péptido en las posiciones equivalentes de unión con otras regiones del bolsillo en la hendidura de unión del MHC.

Se entiende que sustituciones de aminoácidos individuales dentro de un posible epítipo de células T determinado son la vía más preferida para eliminar el epítipo. Pueden contemplarse combinaciones de sustituciones dentro de un único epítipo y, por ejemplo, pueden ser particularmente adecuados cuando se solapan entre sí epítopes definidos individualmente. Además, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos, individualmente dentro de un epítipo determinado o en combinación dentro de un único epítipo en posiciones que no equivalgan a los “restos del bolsillo” con respecto al surco de unión de la molécula MHC de clase II, sino en cualquier punto dentro de la secuencia peptídica. Todas estas sustituciones están dentro del alcance de la presente invención.

Pueden completarse sustituciones de aminoácidos distintas a las realizadas en los péptidos identificados anteriores especialmente cuando se realizan en combinación con sustituciones hechas dentro de uno de los péptidos enumerados. Por ejemplo, se puede contemplar un cambio para restablecer la estructura o actividad biológica de la molécula variante. Estos cambios compensatorios y cambios para incluir la delección o adición de restos de aminoácidos particulares en la molécula según la invención que da lugar a una variante con la actividad deseada y en combinación con cambios en cualquiera de los péptidos descrito se incluyen en el objetivo de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas biológicas con inmunogenicidad reducida. Los métodos para obtener las construcciones génicas y los productos génicos son bien conocidos en la técnica. En un aspecto final, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas biológicas que pueden obtenerse mediante los métodos descritos en la presente invención y métodos para el tratamiento terapéutico de humanos usando las moléculas modificadas y las composiciones farmacéuticas.

Como puede observarse en los siguientes ejemplos, los métodos por ordenador descritos anteriormente en este documento son un indicador muy bueno de dónde es probable encontrar epítopes de células T en cualquier péptido. Por tanto, esto permite la identificación de regiones de secuencias de restos de aminoácidos que, si se alteran mediante cambios de uno o más restos de aminoácidos, tienen el efecto de eliminar epítopes de células T y potenciar, de este modo, el valor terapéutico del péptido. Mediante este método pueden prepararse moléculas biológicas, como péptidos, proteínas, inmunoglobulinas, proteínas de fusión y similares, que tienen propiedades y valor farmacológico potenciados.

La descripción anterior y los ejemplos pretenden ser ilustrativos y no han de tomarse como limitantes. Siguen siendo posibles otras variables y serán fácilmente obvias para los expertos en la materia.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo muestra el perfil de probabilidad de epítopes de células T de la isoforma del autoantígeno ácido glutámico descarboxilasa (GAD 65; PM: 65.000), que está implicado en el desarrollo de la diabetes de tipo I. Esta proteína en particular podría ser un posible objetivo para aumentar la afinidad de los epítopes de células T y también proporciona un buen ejemplo para comprobar el índice de probabilidad de epítopes de células T ya que es un péptido relativamente largo (585 restos de aminoácidos) y, por tanto, proporciona un tamaño de muestra relativamente grande para el perfil.

En la Figura 5 se muestra el perfil de probabilidad de epítopes de células T para GAD 65. La línea continua representa el índice del epítopes de células T calculado usando el método por ordenador mostrado en la Figura 1 y la línea de puntos representa el índice del epítopes de células T predicho usando el método por ordenador mostrado en las Figuras 3 y 4.

#### Ejemplo 2

Este ejemplo muestra el perfil de probabilidad de epítopes de células T de la eritropoyetina (EPO), una citocina de 193 de restos de aminoácidos de longitud, usada ampliamente como fármaco de administración intravenosa (IV) para aumentar el recuento de eritrocitos. Esto representa un buen ejemplo de fármaco biológico con valor terapéutico, pero que podría inducir respuestas inmunes inadecuadas o no deseadas, usándose especialmente la vía de administración IV, y que puede, por tanto, beneficiarse de la desinmunización después de que se haya identificado en la misma los posibles epítopes de células T.

En la Figura 6 se muestra el perfil de probabilidad de epítopes de células T de la EPO. La línea continua representa el índice de epítopes de células T calculado usando el método por ordenador mostrado en la figura 1, y la línea de puntos indica el índice de epítopes de células T predicho usando el método por ordenador mostrado en las Figuras 3 y 4.

#### Ejemplo 3

Las Figuras 7 y 8 muestran el índice de epítopes de células T para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal murino humanizado dirigido frente al antígeno A33. Este último es una glucoproteína transmembrana que se expresa sobre la superficie de >95% de los cánceres de intestino y, por tanto, tiene posibilidades como agente terapéutico anticancerígeno.

En las Figuras 7 y 8, la línea continua representa el índice del epítopes de células T calculado usando el método por ordenador mostrado en la Figura 1, y la línea de puntos indica el índice de epítopes de células T predicho usando el método por ordenador mostrado en las Figuras 3 y 4.

#### Ejemplo 4

##### *Leptina*

Una de estas moléculas de valor terapéutico es la proteína de la obesidad humana, denominada "leptina". La leptina es una proteína de señalización secretada de 146 restos de aminoácidos implicada en los mecanismos homeostáticos que mantienen la masa adiposa (por ejemplo, los documentos WO 00/40615, WO 98/28427 y WO 96/05309). La proteína (y sus antagonistas) ofrece posibilidades terapéuticas significativas para el tratamiento de la diabetes, presión arterial elevada y metabolismo del colesterol. La proteína puede producirse mediante tecnología de recombinación usando varios tipos de células T hospedadoras diferentes. La secuencia de aminoácidos de la leptina (mostrada en código de una letra) es la siguiente:

```
VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQIILTSM
PSRNVIIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDM
LWQLDLSPGC
```

## ES 2 309 167 T3

A partir del grupo identificado según el método de la invención se selecciona una secuencia de aminoácidos que es parte de la secuencia de una proteína de la obesidad humana (leptina) inmunogénicamente no modificada y con una posible actividad de unión a la molécula MHC de clase II:

VPIQKVQDDTKTL, QKVQDDTKTLIKT, KTLIKTIVTRIND, TLIKTIVTRINDI,  
KTIVTRINDISHT, TIVTRINDISHTQ, TRINDISHTQSVS, NDISHTQSVSSKQ,  
QSVSSKQKVGTGLD, SSKQKVGTGLDFIP, QKVGTGLDFIPGLH, TGLDFIPGLHPIL,  
LDFIPGLHPILTL, DFIPGLHPILTSL, PGLHPILTLSKMD, GLHPILTLSKMDQ,  
HPILTLSKMDQTL, PILTSLKMDQTLA, LTLSKMDQTLAVY, SKMDQTLAVYQQI,  
QTLAVYQQILTSM, LAVYQQILTSMPS, AVYQQILTSMPSR, QQILTSMPSRNVI,  
QILTSMPSRNVIQ, TSMPSRNVIQISN, SRNVIQISNDLEN, RNVIQISNDLENL,  
NVIQISNDLENLR, IQISNDLENLRDL, NDLENLRDLLHVL, LENLRDLLHVLAFL,  
ENLRDLLHVLAFLS, RDLHLVLAFLSKSC, DLLHVLAFLSKSCH, LHVLAFLSKSCHLP,  
HVLAFLSKSCHLPW, LAFLSKSCHLPWAS, CHLPWASGLETLD, SGLETLDLGGVL,  
DSLGGVLEASGYS, SLGGVLEASGYST, GGVLEASGYSTEV, SGYSTEVVALSRL,

Cualquier de las secuencias peptídicas citadas anteriormente puede usarse para su modificación mediante el intercambio de uno o más aminoácidos para obtener una secuencia con inmunogenicidad reducida o nula.

Las sustituciones realizadas según los métodos de la invención que llevan a la eliminación de los posibles epítopes de células T de la leptina humana (TS = tipo salvaje) son:

| Nº de resto | Resto de TS | Sustituciones |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------|-------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3           | I           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 6           | V           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 13          | L           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 14          | I           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 17          | I           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 18          | V           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 21          | I           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 24          | I           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 30          | V           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 36          | V           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 39          | L           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 41          | F           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 42          | I           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 45          | L           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 48          | I           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 49          | L           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 51          | L           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 54          | M           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 58          | L           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 60          | V           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 61          | Y           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 64          | I           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 65          | L           | A             | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |

|    | Nº de Resto<br>resto de TS | Sustituciones |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----|----------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5  | 68                         | M             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 73                         | V             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 74                         | I             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 76                         | I             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 10 | 80                         | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 83                         | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 86                         | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 87                         | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 89                         | V             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 15 | 90                         | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 92                         | F             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 98                         | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 100                        | W             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 20 | 104                        | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 107                        | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 110                        | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 113                        | V             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 25 | 114                        | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 119                        | Y             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 123                        | V             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 124                        | V             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 30 | 126                        | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 129                        | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 133                        | L             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 136                        | M             | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 35 |                            |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

## Ejemplo 5

*Antagonistas de IL-1R*

IL-1 es una citocina inflamatoria y moduladora inmune importante con efectos pleiotrópicos sobre diversos tejidos pero puede contribuir a la patología asociada con artritis reumatoide y otras enfermedades asociadas con daño tisular local. Se ha purificado y se ha clonado el gen de un antagonista del receptor de la IL-1 capaz de inhibir la acción de la IL-1 [Eisenburg S.P. y col. (1990) *Nature*, 343: 341-346; Carter, D.B. y col. (1990) *Nature*, 344: 633-637]. Otros autores han proporcionado moléculas del IL-1Ra [por ejemplo, el documento US 5.075.222].

La secuencia de aminoácidos del IL-1Ra (mostrada en código de una letra) es la siguiente:

50 RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSC  
 VKSGDETRLQLEAVNITDLSENKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPD  
 EGMVTKFYFQEDE

55

A partir del siguiente grupo se selecciona una secuencia de aminoácidos que es parte de la secuencia de un IL-1Ra inmunogénicamente no modificado que tiene una posible actividad de unión a la molécula MHC de clase II:

60 RKSSKMQAFRIWD, SKMQAFRIWDVNQ, QAFRIWDVNQKTF,

65

## ES 2 309 167 T3

FRIWDVNQKTFYLR, RIWDVNQKTFYLR, IWDVNQKTFYLRN,  
 WDVNQKTFYLRNN, KTFYLRNNQLVAG, TFYLRNNQLVAGY,  
 5 FYLRNNQLVAGYL, LRNNQLVAGYLQG, RNNQLVAGYLQGP,  
 NQLVAGYLQGPVN, QLVAGYLQGPNVN, LVAGYLQGPNVNL,  
 AGYLQGPNVNLEE, GYLQGPNVNLEEK, PNVNLEEKIDVVP,  
 10 VNLEEKIDVVPIE, EKIDVVPIEPHAL, IDVVPIEPHALFL,  
 DVVPIEPHALFLG, VPIEPHALFLGIH, HALFLGIHGGKMC,  
 ALFLGIHGGKMCL, LFLGIHGGKMCLS, LGIHGGKMCLSCV,  
 15 GKMCLSCVKSGDE, MCLSCVKSGDETR, SCVKSGDETRLQL,  
 ETRLQLEAVNITD, TRLQLEAVNITDL, LQLEAVNITDLSE,  
 EAVNITDLSENK, VNITDLSENKQD, TDLSENKQDKRF,  
 20 ENRKQDKRFAFIR, KRFAFIRSDSGPT, FAFIRSDSGPTTS,  
 AFIRSDSGPTTSF, TSFESAACPGWFL, SFESAACPGWFLC,  
 PGWFLCTAMEADQ, WFLCTAMEADQPV, TAMEADQPVSLTN,  
 25 QPVSLTNMPDEGV, VSLTNMPDEGVMV, TNMPDEGVMVTKF,  
 PDEGVMVTKFYFQ, EGVMVTKFYFQED, GVMVTKFYFQEDE

30 Cualquiera de las secuencias peptídicas citadas anteriormente puede usarse para su modificación mediante el intercambio de uno o más aminoácidos para obtener una secuencia con inmunogenicidad reducida o nula.

Las sustituciones que llevan a la eliminación de posibles epítopes de células T son:

| N° de resto | de Resto de TS | Sustitución |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------|----------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10          | M              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 13          | F              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 15          | I              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 16          | W              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 18          | V              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 23          | F              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 24          | Y              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 25          | L              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 30          | L              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 31          | V              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 34          | Y              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 35          | L              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 40          | V              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 42          | L              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 46          | I              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 48          | V              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 49          | V              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 51          | I              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 56          | L              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 57          | F              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 58          | L              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 60          | I              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 65          | M              | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |

[illegible]

### Ejemplo 6

*BDNF*

Otra molécula terapéuticamente válida es el “factor neurotrófico derivado de cerebro” (BDNF por sus siglas en inglés) humano. BDNF es una glucoproteína de la familia del factor de crecimiento nervioso. La glucoproteína madura de 119 aminoácidos se procesa a partir de un precursor más grande para producir un factor neurotrófico que promueve la supervivencia de poblaciones de células neuronales [Jones K.R. y Reichardt, L.F. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 8060-8064]. Estas células neuronales se localizan todas en el sistema nervioso central o directamente conectado con éste. Las preparaciones recombinantes de BDNF han facilitado la exploración del potencial terapéutico de la proteína para la estimulación de la regeneración nerviosa y el tratamiento de enfermedades degenerativas.

La secuencia de aminoácidos del factor neutrófico derivado de cerebro (BDNF) humano (mostrada en código de una letra) es la siguiente:

HSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNPMGYTKEGCR  
GIDKRHWNSOCRTTOSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKRGR

Otros autores han proporcionado moléculas de BDNF modificadas [documento US 5.770.577] y estrategias para la producción comercial de moléculas de BDNF recombinantes [documento US 5.986.070].

Se selecciona una secuencia de aminoácidos que es parte de la secuencia de un *factor neurotrófico derivado de cerebro* (BDNF) humano inmunogénicamente no modificado que tiene una posible actividad de unión a moléculas MHC de clase II a partir del siguiente grupo:

GELSVCDSESEWV, LSVCDSESEWVTA, DSESEWVTAADKK, SEWVTAADKKTA V,  
EWVTAADKKTA VD, WVTAADKKTA VDM, KTA VDM SGGTVTV, TA VDM SGGTVTVL,  
VDM SGGTVTVLEK, GTVTVLEKVPVSK, VTVLEKVPVSKGQ, TVLEKVPVSKGQL,  
EKVPVSKGQLKQY, VPVSKGQLKQYFY, GQLKQYFYETKCN, KQYFYETKCNPMG,  
QYFYETKCNPMGY, YFYETKCNPMGYT, NPMGYTKEGCRGI, MGYTKEGCRGIDK,  
RGIDKRHWNSQCR, RHWNSQCRTTQSY, HWNSQCRTTQSYV, QSYVRALTMDSKK,  
SYVRALTMDSKKR, RALTMDSKKRIGW, LTMDSKKRIGWRF, KRIGWRFIRIDTS,  
IGWRFIRIDTSCV, GWRFIRIDTSCVC, WRFIRIDTSCVCT, RFIRIDTSCVCTL,  
IRIDTSCVCTLTI, IDTSCVCTLTIKR

## ES 2 309 167 T3

Cualquiera de las secuencias peptídicas citadas anteriormente puede usarse para su modificación mediante el intercambio de uno o más aminoácidos para obtener una secuencia con inmunogenicidad reducida o nula.

Las sustituciones que llevan a la eliminación de posible epítopes de células T del factor neutrófico derivado de cerebro (BDNF) humano (TS = tipo salvaje) son:

| Nº de resto | Resto de TS | Sustitución |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------|-------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10          | 10 L        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 16 I        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 20 V        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 29 V        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 15          | 31 M        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 36 V        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 38 V        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 39 L        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 20          | 42 V        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 44 V        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 49 L        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 25          | 52 Y        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 53 F        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 54 Y        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 61 M        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 30          | 63 Y        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 71 I        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 76 W        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 86 Y        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 35          | 87 V        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 90 L        | A           | C | D | E | G | H | K | N |   | Q | R | S | T |
|             | 92 M        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 98 I        | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 40          | 100 W       | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 102 F       | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|             | 103 I       | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 45          | 105 I       | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |

### Ejemplo 7

#### EPO

Otra molécula de valor terapéutico es la eritropoyetina (EPO). La EPO es una hormona glucoproteica implicada en la maduración de células progenitoras eritroides en eritrocitos. La EPO natural se produce en el hígado durante la vida fetal y en el riñón en adultos y circula en sangre para estimular la producción de eritrocitos en la médula ósea. La anemia es casi invariablemente una consecuencia de la insuficiencia renal debido a una reducción de la producción de la EPO en el riñón. La EPO recombinante se usa como tratamiento eficaz para la anemia causada por insuficiencia renal crónica. La EPO recombinante (expresada en células de mamíferos) que tiene la secuencia de aminoácidos 1 a 165 de eritropoyetina humana [Jacobs, K. y col. (1985) *Nature*, 313: 806-810; Lin, F.-K. y col. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:7580-7585] contiene tres cadenas de oligosacáridos con enlaces N y uno con enlace O que contienen cada una restos de ácido siálico terminales. Estos últimos son importantes para hacer posible que la EPO evite un rápido aclaramiento en circulación por la proteína de unión a asialoglicoproteínas hepáticas.

La secuencia de aminoácidos de la EPO (mostrada en código de una letra) es la siguiente:

```

APPRLICDSRVLERYLEAKEAEENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLAL
LSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTF
RKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

```

## ES 2 309 167 T3

A partir del siguiente grupo se selecciona una secuencia de aminoácidos que es parte de la secuencia de una *eritropoyetina* (EPO) inmunogénicamente no modificado que tiene una posible actividad de unión a moléculas MHC de clase II:

5      PRICDSRVLERY, RLICDSRVLERYL, ICDSRVLERYLLE, CDSRVLERYLLEA, SRVLERYLLEAKE,  
       RVLERYLLEAKEA, LERYLLEAKEAEN, ERYLLEAKEAENI, RYLLEAKEAENIT, YLLEAKEAENITT,  
       LEAKEAENITTGC, KEAENITTGCAEH, ENITTGCAEHCSL, CSLNENITVDPDK, NENITVDPDKVNF,  
 10    ENITVDPDKVNFY,            NITVDPDKVNFYA,            ITVDPDKVNFYAW,            TKVNFYAWKRMEV,  
       VNFYAWKRMEVGQ,  
       NFWYAWKRMEVGQQ, YAWKRMEVGQQAV, KRMEVGQQAVEVW, RMEVGQQAVEVWQ, MEVGQQAVEVWQG,  
       QAVEVWQGLALLS, AVEVWQGLALLSE, VEVWQGLALLSEA, EVWQGLALLSEAV, VWQGLALLSEAVL,  
 15    WQGLALLSEAVLR, QGLALLSEAVLRG, LALLSEAVLRGQA, ALLSEAVLRGQAL, LSEAVLRGQALLV,  
       SEAVLRGQALLVN, EAVLRGQALLVNS, AVLRGQALLVNSS, QALLVNSSQPWEP, ALLVNSSQPWEPL,  
       LLVNSSQPWEPLQ, QPWEPLQLHVDKA, EPLQLHVDKAVSG, LQLHVDKAVSGLR, LHVVDKAVSGLRSL,  
 20    KAVSGLRSLTTL, SGLRSLTTLRAL, RSLTTLRALGAQ, SLTTLRALGAQK, TTLRALGAQKEA,  
       TLLRALGAQKEAI, RALGAQKEAISPP, AQKEAISPPDAAS, EAISPPDAASAAP, SPPDAASAAPLRT,  
       ASAAPLRTITADT, APLRTITADTFRK, RTITADTFRKLFR, TITADTFRKLFRV, DTFRKLFRVYSNF,  
 25    RKLFVRVYSNFLRG, KLFRVYSNFLRGK, FRVYSNFLRGKLG, RVYSNFLRGKLGK, YSNFLRGKLGKLYT,  
       SNFLRGKLGKLYTG, NFLRGKLGKLYTGE, RGKLGKLYTGEACR, GKLGKLYTGEACRT, LKLYTGEACRTGD,  
       KLYTGEACRTGDR

30    Las sustituciones que llevan a la eliminación de posible epítopes de células T de la eritropoyetina (EPO) humana (TS = tipo salvaje) son:

|    |    | N° de Resto de Sustituciones |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----|----|------------------------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|    |    | resto                        | TS |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 35 |    | 5                            | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 6                            | I  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 11                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 40 |    | 12                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 15                           | Y  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 16                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 45 |    | 17                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 25                           | I  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 35                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 50 |    | 39                           | I  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 41                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 46                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 55 |    | 48                           | F  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 49                           | Y  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 51                           | W  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 60 |    | 54                           | M  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 56                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 61                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 65 |    | 63                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 64                           | W  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 67                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 69 | L                            | A  | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |   |
|    | 70 | L                            | A  | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |   |

## ES 2 309 167 T3

|    |    | Nº de Resto de Sustituciones |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----|----|------------------------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|    |    | resto                        | TS |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 5  |    | 74                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 75                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 80                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 81                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 82                           | N  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 10 | 88                           | W  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 91                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 93                           | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 15 | 95                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 99                           | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 102                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 105                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 20 |    | 108                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 109                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 112                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 119                          | I  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 25 |    | 130                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 133                          | I  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 138                          | F  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 30 | 141                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 142                          | F  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 144                          | V  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 145                          | Y  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 35 |    | 148                          | F  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 149                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 153                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    |    | 155                          | L  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 40 |    | 156                          | Y  | A | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |

### 45 Ejemplo 8

#### 45 *G-CSF*

50 El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citocina hematopoyética importante utilizada actualmente en el tratamiento de indicaciones en las que un aumento del número de neutrófilos en sangre aportará beneficios. Estas incluyen tratamiento del cáncer, diversas enfermedades infecciosas y afecciones relacionadas como la sepsis. G-CSF también se utiliza sólo, o en combinación con otros compuestos y citocinas en la expansión *ex vivo* de células hematopoyéticas para el trasplante de médula ósea.

55 Normalmente se reconocen dos formas de G-CSF humano para esta citocina. Una es una proteína de 177 aminoácidos, la otra es una proteína de 174 aminoácidos [Nagata y col. (1986), *EMBO J.* 5: 575-581]; se ha encontrado que la forma de 174 aminoácidos tiene una mayor actividad biológica específica *in vivo*. Las técnicas de ADN recombinante han permitido la producción de G-CSF en cantidades a escala comercial explotando sistemas de expresión en células hospedadoras tanto eucariotas como procariotas.

60 La secuencia de aminoácidos del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (mostrada en código de una letra) es la siguiente:

65 TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAATYKLCHPEELVLLGHSLSGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS  
QLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
VASHLQSFLEVSYRVLRLHQAQP.

Se han descrito previamente otros análogos de polipéptidos y fragmentos peptídicos de G-CSF, incluyendo formas modificadas mediante sustituciones de aminoácidos específicas de sitio y/o mediante modificaciones por productos de adición química. Así, el documento US 4.810.643 describe análogos con los restos Cys en particular sustituidos con otros aminoácidos y G-CSF con un resto Ala en la primera posición (N-terminal). El documento EP 0335423 describe la modificación de al menos un grupo amino en un polipéptido que tiene actividad G-CSF. El documento EP 0272703 describe derivados de G-CSF que tiene sustituciones o deleciones de aminoácidos próximas al extremo N-terminal. El documento EP 0459630 describe derivados de G-CSF en los que Cys 17 y Asp 27 se sustituyen por restos de Ser. El documento EP 0 243 153 describe G-CSF modificado mediante la inactivación de al menos una proteasa KEX2 de levadura procesando el sitio para aumentar el rendimiento en la producción recombinante y el documento US 4.904.584 describe proteínas con lisina alterada. El documento WO 90/12874 describe además variantes alteradas en Cys y el documento de patente australiana AU 10948/92 describe la adición de aminoácidos en el extremo terminal de una molécula de G-CSF con el fin de facilitar el plegamiento de la molécula después de su expresión procariota. El documento AU-76380/91 describe variantes de G-CSF en las posiciones 50-56 de la forma de 174 aminoácidos del G-CSF y en las posiciones 53-59 de la forma de 177 aminoácidos. También se describieron los cambios adicionales en un resto de His en particular.

A partir del siguiente grupo se selecciona una secuencia de aminoácidos que es parte de la secuencia de un *factor estimulante de colonias de granulocitos* (G-CSF) humano inmunogénicamente no modificado que tiene una posible actividad de unión a moléculas MHC de clase II:

TPLGPASSLPQSF, SSLPQSFLKCLE, QSFLKCLEQVRK, SFLKCLEQVRKI,  
 FLLKCLEQVRKIQ, KCLEQVRKIQGDG, EQVRKIQGDGAAL, RKIQGDGAALQEK,  
 AALQEKLVSECAT, EKLVSSECATYKLC, KLVSECATYKLCH, AALQEKLCATYKL,  
 EKLKATYKLCHPE, ATYKLCHPEELVL, YKLCHPEELVLLG, EELVLLGHSLGIP,  
 ELVLLGHSLGIPW, HSLGIPWAPLSSC, IPWAPLSSCPSQA, APLSSCPSQALQL,  
 QALQLAGCLSQLH, GCLSQLHSGFLY, SQLHSGFLYQGL, SGLFLYQGLLQAL,  
 GLFLYQGLLQALE, LFLYQGLLQALEG, FLYQGLLQALEGI, QGLLQALEGISPE,  
 GLLQALEGISPEL, QALEGISPELGPT, EGISPELGPTLDT, PTLDTLQLDVADF,  
 DTLQLDVADFATT, LQLDVADFATTIW, LDVADFATTIWQQ, TTIWQQMEELGMA,  
 TIWQQMEELGMAP, QQMEELGMAPALQ, EELGMAPALQPTQ, LGMAPALQPTQGA,  
 PALQPTQGAMPAF, GAMPAFASAFQRR, PAFASAFQRRAGG, SAFQRRAGGVLA,  
 GGVLVASHLQSFL, GVLVASHLQSFLE, VLVASHLQSFLEV, SHLQSFLEVSYRV,  
 QSFLEVSYRVLRH, SFLEVSYRVLRLH, LEVSYRVLRLHAQ

Puede usarse cualquiera de las secuencias peptídicas mencionadas anteriormente para su modificación mediante el intercambio uno o más aminoácidos para obtener una secuencia que tiene una inmunogenicidad reducida o nula.

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 309 167 T3

Las sustituciones que llevan a la eliminación de posible epítopes de células T del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano (TS = tipo salvaje) son:

| N° de resto | Resto de TS | Sustitución |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------|-------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3           | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 9           | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 14          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 15          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 18          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 21          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 24          | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 31          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 35          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 39          | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 41          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 47          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 48          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 49          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 50          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 54          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 56          | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 58          | W           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 61          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 69          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 71          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 75          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 78          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |

|    | Nº    | de | Resto de | Sustitución |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----|-------|----|----------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|    | resto | TS |          |             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 5  | 82    | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 83    | F  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 84    | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 85    | Y  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 10 | 88    | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 89    | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 92    | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 15 | 95    | I  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 99    | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 103   | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 20 | 106   | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 108   | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 110   | V  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 113   | F  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 117   | I  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 25 | 118   | W  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 121   | M  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 124   | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 30 | 130   | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 137   | M  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 140   | F  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 144   | F  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 35 | 151   | V  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 152   | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 153   | V  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 40 | 157   | L  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 160   | F  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 161   | F  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
|    | 163   | V  | A        | C           | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |

#### Ejemplo 9

##### KGF

Otra molécula valiosa es el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF, por sus siglas en inglés). KGF es un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)/factor de crecimiento de unión a heparina. Es una glucoproteína secretada que se expresa predominantemente en el pulmón, promoviendo la cicatrización de la herida estimulando el crecimiento de queratinocitos y otras células epiteliales [Finch y col. (1989), *Science* 24: 752-755; Rubin y col. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 802-806]. La forma madura (procesada) de la glucoproteína comprende 163 restos de aminoácidos y puede aislarse a partir de medios condicionados tras el cultivo de líneas celulares particulares [Rubin y col. (1989) *ibid.*], o producida usando técnicas de recombinación [Ron y col. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988]. La proteína tiene valor terapéutico para la estimulación del crecimiento de células epiteliales en varias enfermedades significativas y en el contexto de reparación de lesiones. Esta descripción se aplica específicamente a la proteína KGF humana que tiene la forma madura (procesada) de 163 restos de aminoácidos.

Otros autores también han proporcionado moléculas de KGF [por ejemplo, los documentos US 6.008.328 y WO90/08771] incluyendo KGF modificado [Ron y col. (1993) *ibid.*; documento WO9501434]. Sin embargo, en ninguna de estas descripciones se reconoce la importancia de los epítopes de células T para las propiedades inmunogénicas de la proteína ni se han concebido para afectar directamente a dichas propiedades de forma específica y controlada de acuerdo con el esquema de la presente invención.

## ES 2 309 167 T3

La secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) (mostrada en código de una letra) es la siguiente:

MCNDMTPEQMATNVNCSSPERHTRSVDYMEGGDIRVRRLLFCRTQWYLRLDKRGKVKGTQEMKNNYNIME  
IRTVAVGIVAIKGVSEFYLAMNKEGKLYAKKECNEDCNFKELILENHYNTYASAKWTHNGGEMFVALN  
QKGIPVRGKKTKEQKTAHFLPMAIT

A partir del siguiente grupo se selecciona una secuencia de aminoácidos que es parte de la secuencia de un *factor de crecimiento de queratinocitos* (KGF) humano inmunogénicamente no modificado que tiene una posible actividad de unión a moléculas MHC de clase II:

NDMTPEQMATNVN, DMTPEQMATNVNC, EQMATNVNCSSPE, TNVNCSSPERHTR,  
RSVDYMEGGDIRV, YDYMEGGDIRVRR, DYMEGGDIRVRRLL, GDIRVRRLLFCRTQ,  
IRVRRLLFCRTQWY, RRLFCRTQWYLRI, RLFCRTQWYLRLD, TQWYLRLDKRGKV,  
QWYLRLDKRGKVK, WYLRLDKRGKVKG, LRLDKRGKVKGTQ, GKVKGVTQEMKNNY,  
QEMKNNYNIMEIR, NNNYNIMEIRTVAV, YNIMEIRTVAVGI, NIMEIRTVAVGIV,  
MEIRTVAVGIVAI, RTVAVGIVAIKGV, VAVGIVAIKGVES, VGIVAIKGVSEF,  
VAIKGVSEFYL, KGVSEFYLAMNK, SEFYLAMNKEGKL, EFYLAMNKEGKLY,  
FYLAMNKEGKLYA, LAMNKEGKLYAKK, GKLYAKKECNEDC, KLYAKKECNEDCN,  
CNFKELILENHYN, KELILENHYNTYA, ELILENHYNTYAS, LILENHYNTYASA,  
NHYNTYASAKWTH, NTYASAKWTHNGG, AKWTHNGGEMFVA, GEMFVALNQKGIP,  
EMFVALNQKGIPV, FVALNQKGIPVRG, VALNQKGIPVRGK, KGIPVRGKKTKE,  
IPVRGKKTKEQK, KTKKEQKTAHFLP

## ES 2 309 167 T3

Cualquiera de las secuencias peptídicas mencionadas anteriormente puede usarse para su modificación mediante el intercambio de uno o más aminoácidos para obtener una secuencia que tiene inmunogenicidad reducida o nula. Las sustituciones que llevan a la eliminación de posible epítopes de células T del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) humano (TS = tipo salvaje) son:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

| Nº de resto | Resto de TS | Sustitución |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------|-------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5           | M           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 10          | M           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 14          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 26          | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 28          | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 29          | M           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 34          | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 36          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 39          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 40          | F           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 45          | W           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 46          | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 47          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 49          | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 55          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 61          | M           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 65          | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 67          | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 68          | M           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 70          | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 73          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 75          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 77          | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 78          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 80          | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 83          | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 87          | F           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 88          | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 89          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 91          | M           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 97          | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 98          | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 109         | F           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 112         | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 113         | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 114         | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 118         | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 121         | Y           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 126         | W           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 133         | M           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 134         | F           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 135         | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 137         | L           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 142         | I           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |
| 144         | V           | A           | C | D | E | G | H | K | N | P | Q | R | S | T |

## Ejemplo 10

*TNF-RI soluble*

5 El sTNF-RI (receptor soluble del factor de necrosis tumoral de tipo I) es un derivado del receptor del factor de necrosis tumoral humano descrito previamente [Gray, P.W. y col. (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 7380-7384; Loetschere, H. y col., (1990) *Cell* 61: 351-359; Schall, T.J. y col. (1990) *Cell* 61: 361-370], que comprende el dominio extracelular del receptor intacto y muestra un peso molecular aproximado de 30 kDa. También se muestran inhibidores solubles de TNF adicionales y, en particular, una forma de 40 KDa [documento US 6.143.866]. Las formas solubles  
 10 son capaces de unirse al factor de necrosis tumoral alfa con alta afinidad e inhibir *in vitro* la actividad citotóxica de la citocina. Las preparaciones recombinantes de sTNF-RI tienen un valor terapéutico significativo para el tratamiento de enfermedades en las que un nivel excesivo de factor de necrosis tumoral causa un efecto patogénico. Las indicaciones, como caquexia, sepsis y enfermedades autoinmunes que incluyen, en particular, artritis reumatoides y otras pueden ser abordadas mediante estas preparaciones terapéuticas de sTNF-RI. Otros documentos, incluyendo Brewer y col. y  
 15 el documento US 6.143.866, han proporcionado moléculas de sTNF-RI modificadas.

Las secuencias peptídicas de una sTNF-RI humana de 30 kDa con posible actividad de unión a moléculas MHC de clase II humanas son:

20  
 DSVCPQGKYIHPQ, KYIHPQNNISICT, NSICTCKCHKGTY, TYLYNDPCPGPGQD,  
 YLYNDPCPGPGQDT, NHLRHCLSCSKCR, HCLSCSKCRKEMG, KEMGQVEISSCTV,  
 25 GQVEISSCTVDRD, VEISSCTVDRDTV, CTVDRDTVCGCRK, DTVCGCRKNQYRH,  
 NQYRHYWSENLFQ, RHYWSENLFQCFN, HYWSENLFQCFNC, ENLFQCFNCSLCL,  
 NLFQCFNCSLCLN, QCFNCSLCLNGTV, CSLCLNGTVHLSC, LCLNGTVHLSCQE,  
 30 GTVHLSCQEKQNT, VHLSCQEKQNTVC, EKQNTVCTCHAGF, NTVCTCHAGFFLR,  
 GFFLRENECVSCS, FFLRENECVSCSN, ECVSCSNCKKSLE, KSLECTKLCLPQI,  
 TKLCLPQIENVKG, LCLPQIENVKGTE, PQIENVKGTEDSG, SGTTVLLPLVIFV

35

Puede usarse cualquiera de las secuencias peptídicas mencionadas anteriormente para su modificación mediante el intercambio de uno o más aminoácidos para obtener una secuencia que tiene una inmunogenicidad reducida o nula.

40

## Ejemplo 11

*TNF-R2 soluble*

45

El receptor soluble del factor de necrosis tumoral de tipo 2 (sTNF-R2) es un derivado del factor de necrosis tumoral humano de tipo 2 descrito previamente [Smith, C.A. y col (1990) *Science* 248: 1019-1023; Kohno, T. y col. (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8331-8335; Beltiger, C.P. y col. (1996) *Genomics* 35:94-100] que comprende el dominio extracelular del receptor intacto. Las formas solubles son capaces de unirse al factor de necrosis tumoral con alta afinidad e inhibir *in vitro* la actividad citotóxica de la citocina. Las preparaciones recombinantes de sTNF-R2 tienen un valor terapéutico significativo para el tratamiento de enfermedades en las que un nivel excesivo de factor de necrosis tumoral causa un efecto patogénico. Una preparación recombinante en particular, denominada etanercept, ha obtenido la aprobación clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide y, este u otros agentes similares pueden ser válidos para el tratamiento de otras indicaciones como caquexia, sepsis y trastornos autoinmunes. Etanercept es una  
 50 proteína de fusión dimérica que comprende el dominio extracelular de la molécula TNF-R2 humano en combinación con el dominio Fc de la molécula de IgG1 humana. La molécula dimérica comprende 934 aminoácidos [documentos US 5.395.760, US 5.605.690, US 5.945.397 y US RE36.755].

55

60

65

## ES 2 309 167 T3

Las secuencias peptídicas del dominio de unión a TNF de la proteína TNF-R2 humana con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

5 TPYAPEPGSTCRL, CRLREYYDQTAQM, REYYDQTAQMCCS, EYYDQTAQMCCSK,  
 AQMCCSKCSPGQH, KCSPGQHAKVFCT, AKVFCTKTSDTVCD, KVFCTKTSDTVCD,  
 STYTQLWNWVPEC, TQLWNWVPECLSC, QLWNWVPECLSCG, NWVPECLSCGSRG,  
 10 ECLSCGSRGSSDQ, SRCSSDQEVQAC, QEVQACTREQNR, QNRICRCPGWYC,  
 NRICRCPGWYCA, PGWYCALSKQEGC, GWYCALSKQEGCR, CALSKQEGCRCLCA,  
 APLRKCRPGFGVA, PGFGVARPGTETS, FGVARPGTETSDV, SDVVCKPCAPGTF,  
 15 GTFSNTTSSSTIC, TDICRPHQICNVV, HQICNVVAIPGNA, ICNVVAIPGNASR,  
 CNVVAIPGNASRD, NVVAIPGNASRDA, VAIPGNASRDAVC, DAVCTSTTTPTRS,  
 TRSMAPGAVHLPQ, RSMAPGAVHLPQP, VHLPQPVSTRSQH, QPVSTRSQHTQPT,  
 20 PEPSTAPSTSFL, SFLPMGPSPPAE, FLLPMGPSPPAEG

### 25 Ejemplo 12

#### *$\beta$ -GCR*

30 La beta-glucocerebrosidasa (b-D-glucosil-N-acilesfingosina glucosidrolasa, E.C. 3.2.1.45) es una glucoproteína monomérica de 497 restos de aminoácidos. La enzima cataliza la hidrólisis del glucolípido glucocerebrósido a glucosa y ceramida. La deficiencia en la actividad de la GCR da lugar a una enfermedad por almacenamiento lisosomal denominada enfermedad de Gaucher. La enfermedad se caracteriza por la acumulación de macrófagos tisulares repletos de glucocerebrósido que se acumulan en el hígado, bazo, médula ósea y otros órganos. La enfermedad tiene  
 35 diversos grados de gravedad, desde la enfermedad de tipo 1 con problemas hematológicos pero sin afección neuronal, a la enfermedad de tipo 2 que se manifiesta de forma prematura después del nacimiento con una amplia afección neuronal y siempre progresiva y mortal antes de los 2 años de edad. En algunas clasificaciones también se reconoce la enfermedad de tipo 3 que también muestra afección neurológica. Anteriormente, el único tratamiento útil para la enfermedad de Gaucher ha sido la administración de GCR derivado de placenta humana (conocida como al-glucerasa), pero más recientemente, preparaciones farmacéuticas de GCR recombinante ("ceredasa" y "cerezyme")  
 40 han mostrado su eficacia en el tratamiento de la enfermedad de tipo I [Niederau, C. y col. (1998) *Eur. J. Med. Res.* 3: 25-30].

Las secuencias peptídicas del GCR humano con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

45 PCIPKSFYSSVV, KSFYSSVVCVCN, FGYSSVVCVCNAT, SSVVCVCNATYCD, SVVCVCNATYCD,  
 VCVCNATYCDSD, ATYCDSDPPTFP, DSFDPTFPALGT, PTFPALGTFSRYE, PALGTFSRYESTR,  
 50 GTFSRYESTRSGR, SRYESTRSGRME, GRMELSMGPIQA, RRMELSMGPIQAN, RMELSMGPIQANH,  
 MELSMGPIQANHT, LSMGPIQANHTGT, MGPIQANHTGTGL, GPIQANHTGTGLL, TGLLLTLQPEQKF,

55

60

65

ES 2 309 167 T3

GLLLTQPEQKFQ, LLLTLQPEQKFQK, LTLQPEQKFQKVK, TLQPEQKFQKVKG, PEQKFQKVKGFGG,  
 QKFQKVKGFGGAM, QKVKGFGGAMTDA, KGFGGAMTDAAAL, GFGGAMTDAAALN, GAMTDAAALNILA,  
 5 AMTDAAALNILAL, MTDAAALNILALS, AALNILALSPPAQ, ALNILALSPPAQN, LNILALSPPAQNL,  
 NILALSPPAQNLL, LALSPPAQNLLLK, ALSPPAQNLLLKS, PAQNLLLKSYPFSE, AQNLLLKSYPFSEE,  
 QNLLLKSYPFSEEG, NLLLKSYPFSEEGI, LLLKSYPFSEEGIG, KSYFSEEGIGYNI, SYFSEEGIGYNI,  
 10 FSEEGIGYNIIRV, EGIGYNIIRVPM, GIGYNIIRVPMAS, IGYNIIRVPMASC, YNIIRVPMASCDF,  
 NIIRVPMASCDFS, IIRVPMASCDFSIR, IRVPMASCDFSIRTY, VPMASCDFSIRTYT, PMASCDFSIRTYT,  
 SCDFSIRTYTYAD, CDFSIRTYTYADT, FSIRTYTYADTPD, RTYTYADTPDDFQ, TYTYADTPDDFQL,  
 15 YTYADTPDDFQLH, ADTPDDFQLHNFS, PDDFQLHNFSLPE, DDFQLHNFSLPEE, FQLHNFSLPEEDT,  
 HNFSLPEEDTKLK, FSLPEEDTKLKIP, SLPEEDTKLKIPL, EEDTKLKIPLIHR, TKLKIPLIHRALQ,  
 KLKIPLIHRALQL, LKIPLIHRALQLA, IPLIHRALQLAQR, PLIHRALQLAQR, HRALQLAQRVSL,  
 20 RALQLAQRVSL, ALQLAQRVSLLA, LQLAQRVSLLAS, RPVSLASPWTSP, PVSLLASPWTSPT,  
 VSLASPWTSPTW, SLLASPWTSPTWL, SPWTSPTWLKTNG, TSPTWLKTNGAVN, PTWLKTNGAVNGK,  
 TWLKTNGAVNGKG, GAVNGKGSGLKGP, GSKGQPGDIYHQ, GDIYHQWTWARYFV, DIYHQWTWARYFVK,  
 25 QTWARYFVKFLDA, WARYFVKFLDAYA, ARYFVKFLDAYAE, RYFVKFLDAYAEH, YFVKFLDAYAEHK,  
 FVKFLDAYAEHKL, VKFLDAYAEHKLQ, KFLDAYAEHKLQF, DAYAEHKLQFVAV, YAEHKLQFVAVTA,  
 HKLQFVAVTAENE, LQFVAVTAENEPS, QFVAVTAENEPSA, FVAVTAENEPSAG, WAVTAENEPSAGL,  
 30 VTAENEPSAGLLS, PSAGLLSGYPFQC, AGLLSGYPFQCLG, GLLSGYPFQCLGF, SGYPFQCLGFTPE,  
 YPFQCLGFTPEHQ, QCLGFTPEHQRF, LGFTPEHQRFIA, FTPEHQRFIARD, RFIARDLGPTLA,  
 DFIARDLGPTLAN, RDLGPTLANSTHH, LGPTLANSTHHNV, PTLANSTHHNVRL, HNVRLMLDDQRL,  
 35 VRLMLDDQRLLL, RLLMLDDQRLLLP, LLMLDDQRLLLPH, LMLDDQRLLLPHW, DDQRLLLPHWAKV,  
 DQRLLLPHWAKVV, QRLLLPHWAKVVL, RLLPHWAKVVL, LLLPHWAKVVLTD, PHWAKVVLTDPEA,  
 WAKVVLTDPEAAK, AKVVLTDPEAAKY, KVVLTDPEAAKYV, VVLTDPEAAKYVH, EAAKYVHGIAVHW,  
 40 AKYVHGIAVHWYL, KYVHGIAVHWYLD, YVHGIAVHWYLD, HGIAVHWYLDLFA, IAVHWYLDLFLA,  
 VHWYLDLFLAPAKA, HWYLDLFLAPAKAT, WYLDLFLAPAKATL, LDFLAPAKATLGE, DFLAPAKATLGET,  
 AKATLGETHRLFP, ATLGETHRLFPNT, GETHRLFPNTMLF, ETHRLFPNTMLFA, THRLFPNTMLFAS,  
 45 HRLFPNTMLFASE, RLFPNTMLFASEA, FPNTMLFASEACV, NTMLFASEACVGS, TMLFASEACVGSK,  
 MLFASEACVGSKF, ACVGSKFWEQSVR, GSKFWEQSVRLGS, SKFWEQSVRLGSW, KFWEQSVRLGSWD,  
 QSVRLGSWDRGMQ, VRLGSWDRGMQYS, RLGSWDRGMQYSH, GSWDRGMQYSHSI, WDRGMQYSHSIIT,  
 50 RGMQYSHSIITNL, MQYSHSIITNLLY, QYSHSIITNLLYH, YSHSIITNLLYHV, HSIITNLLYHVV,  
 SIITNLLYHVVGW, TNLLYHVVGWTDW, NLLYHVVGWTDWN, LLYHVVGWTDWNL, YHVVGWTDWNLAL,  
 HVVGWTDWNLALN, VVGWTDWNLALNP, VGWTDWNLALNPE, TDWNLALNPEGGP, WNALNPEGGPNW,  
 55 LALNPEGGPNWVR, PNWVRNFVDSPII, NWVRNFVDSPIIV, RNFVDSPIIVDIT, NFVDSPIIVDITK,  
 SPIIVDITKDTFY, PIIVDITKDTFYK, IIVDITKDTFYKQ, VDITKDTFYKQPM, DTFYKQPMFYHLG,  
 TFYKQPMFYHLGH, QPMFYHLGHFSKF, PMFYHLGHFSKFI, MFYHLGHFSKFIP, YHLGHFSKFIPFEG,  
 60 GHFSKFIPFEGSQR, SKFIPFEGSQRVGL, KFIPEGSRVGLV, IPEGSRVGLVAS, QRVGLVASQKNDL,  
 VGLVASQKNDLDA, GLVASQKNDLDAV, SQKNDLDAVALMH, NDLDAVALMHDPDG, DAVALMHDPDGSAV,  
 VALMHDPDGSAVVV, ALMHDPDGSAVVVV, SAVVVVLNRSSKD, AVVVVLNRSSKDV, VVVVLNRSSKDVPL,  
 65 VVVLNRSSKDVPL, VVVLNRSSKDVPLT, KDVPLTIKDPVAVG, VPLTIKDPVAVGFL, PLTIKDPVAVGFLE

LTIKDPAVGFLET, PAVGFLETISPGY, VGFLETISPGYSI, GFLETISPGYSIH, FLETISPGYSIHT,  
ETISPGYSIHTYL, PGYSIHTYLWHRO, PGYSIHTYLWRRO

5 Ejemplo 13

## Proteína C

La proteína C es una serina proteasa dependiente de vitamina K implicada en la regulación de la coagulación sanguínea. La proteína se activa a través de la trombina para producir la proteína C activada que, a su vez, degrada (regula por descenso) los factores Va y VIIIa de la cascada de coagulación. La proteína C se expresa en el hígado como un precursor de cadena sencilla y experimenta una serie de etapas de procesamiento que dan lugar a una molécula compuesta de una cadena ligera y una cadena pesada que se mantienen unidas mediante un puente disulfuro. La proteína C se activa mediante la escisión de un tetradecapéptido del extremo N-terminal de la cadena pesada por medio de la trombina. Las preparaciones farmacéuticas de la proteína C en la forma nativa o activada son válidas para el tratamiento de pacientes con trastornos vasculares y/o deficiencias adquiridas de proteína C. Entre estos pacientes se incluyen, por tanto, individuos que padecen ictus trombótico o deficiencia de proteína C asociada con sepsis, procedimientos de trasplante, embarazo, quemaduras graves, cirugía mayor u otros traumatismos graves. La proteína C también se usa en el tratamiento de individuos con deficiencia hereditaria de proteína C. Esta descripción se refiere específicamente a la proteína C humana, siendo la forma madura (procesada) la que comprende una cadena ligera de 155 restos de aminoácidos y una cadena pesada de 262 restos de aminoácidos [Foster, D.C. y col. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 4673-4677; Beckman, R.J. y col. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13: 5233-5247]. Se han proporcionado otras moléculas de proteína C que incluyen formulaciones de proteína C activada y métodos de uso [documentos US 6.159.468, US 6.156.734, US 6.037.322 y US 5.618.714]. Las secuencias peptídicas de la cadena pesada de la proteína C humana con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

|    |                |                 |                |                |                 |
|----|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
|    | DQEDQVDPRLIDG, | QEDQVDPRLIDGK,  | DQVDPRLIDGKMT, | QVDPRLIDGKMTR, | VDPRLLIDGKMTRR, |
| 30 | DPRLIDGKMTRRG, | PRLLIDGKMTRRGD, | RLIDGKMTRRGDS, | SPWQVVLDSKLL,  | WQVVLDSKLLKLA,  |
|    | QVVLDSKLLKLA,  | VVLDSKLLKLAG,   | VLLDSKLLKLAGA, | DSKLLKLAGAVLI, | SKLLKLAGAVLIH,  |
|    | KKLAGAVLIHPS,  | CGAVLIHPSWVLT,  | GAVLIHPSWVLT,  | VLIHPSWVLTAAH, | PSWVLTAAHCMDE,  |
| 35 | SWVLTAAHCMDES, | WVLTAAHCMDESK,  | AAHCMDESKLLV,  | HCMDESKLLVRL,  | SKLLVRLGEYDL,   |
|    | KKLLVRLGEYDLR, | KLLVRLGEYDLRR,  | LLVRLGEYDLRRW, | VRLGEYDLRRWEK, | RLGEYDLRRWEKW,  |
|    | LGEYDLRRWEKWE, | GEYDLRRWEKWEL,  | YDLRRWEKWELDL, | RRWEKWELDLDIK, | EKWELDLDIKEVF,  |
| 40 | WELDLDIKEVVFH, | LDLDIKEVVFHPN,  | LDIKEVVFHPNYS, | IKEVVFHPNYSKS, | KEVVFHPNYSKST,  |
|    | EVVFHPNYSKSTT, | VVFHPNYSKSTTD,  | PNYSKSTTDNDIA, | SKSTTDNDIALH,  | TTDNDIALHHLAQ,  |
|    | TDNDIALHHLAQ,  | DNDIALHHLAQPA,  | NDIALHHLAQPAT, | IALHHLAQPATLS, | ALLHLAQPATLSQ,  |
| 45 | LHLAQPATLSQTI, | AQPATLSQTIPI,   | PATLSQTIPICL,  | ATLSQTIPICLP,  | TLSQTIPICLPD,   |
|    | QTIVPICLPDGL,  | TIVPICLPDGLA,   | IVPICLPDGLAE,  | VPICLPDGLAER,  | ICLPDGLAEREL,   |
|    | PDGLAERELNQA,  | SGLAERELNQAQ,   | GLAERELNQAQE,  | LAERELNQAQET,  | RELNQAQETLVT,   |
| 50 | GQETLVTGWGYHS, | ETLVTGWGYHSS,   | TLVTGWGYHSSRE, | TGWGYHSSREKEA, | WGYHSSREKEAKR,  |
|    | WGYHSSREKEAKR, | SREKEAKRNRTFV,  | RNRTFVLNFIKIP, | NRTFVLNFIKIPV, | RTFVLNFIKIPVV,  |
|    | TFVLNFIKIPVVP, | FVLNFIKIPVVP,   | LNFIKIPVVPHNE, | NFIKIPVVPHNEC, | IKIPVVPHNECSE,  |
| 55 | IPVVPHNECSEVM, | PVVPHNECSEVMS,  | VVPHNECSEVMSN, | NECSEVMSNMVSE, | SEVMSNMVSENML,  |
|    | EVMSNMVSENMLC, | VMSNMVSENMLCA,  | SNMVSENMLCAGI, | MVSENMLCAGILG, | VSENMLCAGILGD,  |
|    | ENMLCAGILGDRQ, | NMLCAGILGDRQD,  | AGILGDRQDACEG, | GILGDRQDACEGD, | GPMVASFHGTWFL,  |
| 60 | PMVASFHGTWFLV, | MVASFHGTWFLVG,  | ASFHGTWFLVGLV, | GTWFLVGLVSWGE, | TWFLVGLVSWGEG,  |
|    | WFLVGLVSWGEGC, | FLVGLVSWGEGCG,  | VGLVSWGEGCGLL, | GLVSWGEGCGLLH, | VSWGEGCGLLHNY,  |
|    | EGCGLLHNYGVYT, | CGLLHNYGVYTKV,  | GLLHNYGVYTKVS, | LHNYGVYTKVSRY, | HNYGVYTKVSRYL,  |
| 65 | YGVYTKVSRYLDW, | GVYTKVSRYLDWI,  | TKVSRYLDWIHGH, | SRYLDWIHGHIRD, | RYLDWIHGHIRDK,  |
|    | LDWIHGHIRDKEA, | DWIHGHIRDKCAP,  | HGHIRDKCAPQKS, | GHIRDKCAPQKSW  |                 |

## ES 2 309 167 T3

Las secuencias peptídicas de la cadena ligera de la proteína C humana con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

NSFLEELRHSSLE, SFLEELRHSSLER, EELRHSSLERECI, LRHSSLERECIEE, SSLERECIEEICD,  
ECIEEICDFEEAK, IEEICDFEEAKEI, EEICDFEEAKEIF, EICDFEEAKEIFQ, CDFEEAKEIFQNV,  
KEIFQNVDDTLAF, EIFQNVDDTLAFW, IFQNVDDTLAFWS, QNVDDTLAFWSKH, DDTLAFWSKHVDG,  
DTLAFWSKHVDGD, LAFWSKHVDGDQC, AFWSKHVDGDQCL, WSKHVDGDQCLVL, KHVDGDQCLVLPL,  
QCLVLPLEHPCAS, CLVLPLEHPCASL, LVLPLEHPCASLC, LPLEHPCASLCCG, ASLCCGHGTCIDG,  
HGTCIDGIGSFSC, TCIDGIGSFSCDC, DGIGSFSCDCRSG, GSFSCDCRSGWEG, CRSGWEGRFCQRE,  
SGWEGRFCQREVS, GWEGRFCQREVSF, GRFCQREVSFLNC, RFCQREVSFLNCS, QREVSFLNCSLDN,  
REVSFLNCSLDNG, VSFLNCSLDNGGC, SFLNCSLDNGGCT, CSLDNGGCTHYCL, THYCLEEVGWRRRC,  
YCLEEVGWRRRCSC, EEVWRRRCSCAPG, VGWRRRCSCAPGYK, RRCSCAPGYKLGD, APGYKLGDLLQC,  
PGYKLGDLLQCH, YKLGDLLQCHPA, LGDLLQCHPAVK, GDDLLQCHPAVKF, DDLQCHPAVKFP,  
DLLQCHPAVKFPC, PAVKFPCGRPWK, VKFPCGRPWKME, RPWKMEKKRSHL

### Ejemplo 14

#### *Subtilisinas*

La subtilisinas son una clase de enzimas proteasas con importancia económica e industrial. Pueden usarse como componentes de detergentes o cosméticos o en la producción de tejidos y otras industrias y preparaciones para el consumidor. La exposición de algunos seres humanos en particular a subtilisinas bacterianas puede provocar una reacción de hipersensibilidad no deseada en dichos individuos. Existe una necesidad de análogos de subtilisina con propiedades mejoradas y, especialmente, mejoras en las propiedades biológicas de la proteína. A este respecto, es muy conveniente que se proporcionen subtilisinas con un potencial reducido o nulo para inducir una respuesta inmune en el ser humano. Las proteínas subtilisinas, como las identificadas a partir de otras fuentes que incluyen fuentes bacterianas, fúngicas o de vertebrados, como organismos mamíferos y el ser humano, tienen en común muchas de las secuencias peptídicas de la presente descripción y tienen en común muchas secuencias peptídicas sustancialmente con la misma secuencia que las que se incluyen en el listado descrito. Igualmente, por tanto, estas secuencias de proteínas entran dentro del alcance de la presente invención. Se han proporcionado otras moléculas de subtilisina que incluyen subtilisinas modificadas [documentos US 5.700.676, US 4.914.031, US 5.397.705 y US 5.972.682].

## ES 2 309 167 T3

Las secuencias peptídicas de la subtilisina de *B. lentus* con posible actividad de unión a de MHC de clase II humano son:

5 QSVPWGISRVQAP, SVPWGISRVQAPA, WGISRVQAPAAHN, SRVQAPAAHNRGL,  
VQAPAAHNRGLTG, AHNRLTGSQVAVL, RGLTGSQVAVL, SGVAVLDTGIS,  
GVAVLDTGIST, VKAVLDTGISTH, VAVLDTGISTHPD, AVLDTGISTHPDL,  
10 TGISTHPDLNIRG, ISTHPDLNIRGGA, HPDLNIRGGASFV, PDLNIRGGASFVP,  
LNIRGGASFVPGE, ASFVPGEPTQDG, SFVPGEPTQDGN, EPSTQDGNHGHGTH,  
GHGTHVAGTIAAL, HGTHVAGTIAALN, THVAGTIAALNNS, AGTIAALNNSIGV,  
15 GTIAALNNSIGVL, AALNNSIGVLGVA, ALNNSIGVLGVAP, NSIGVLGVAPSAE,  
GVLGVAPSAELYA, LGVAPSAELYAVK, APSAELYAVKVLG, AELYAVKVLGASG,  
ELYAVKVLGASGS, YAVKVLGASGS, VKVLGASGS, KVLGASGS,  
20 SGSGSVSSIAQGL, SGSVSSIAQGLEW, GSVSSIAQGLEWA, SSIAQGLEWAGNN,  
QGLEWAGNNGMHV, LEWAGNNGMHVAN, NNGMHVANLSLGS, NGMHVANLSLGS,  
MHVANLSLGS, VANLSLGS, ANLSLGS,  
25 LSLGS, SPSPSATLEQAVN, SPSPSATLEQAVNSA, PSATLEQAVNSAT,  
ATLEQAVNSATSR, TLEQAVNSATSRG, QAVNSATSRGVLV, RGVLVVAASGNSG,  
GVLVVAASGNSGA, VLVVAASGNSGAG, LVVAASGNSGAGS, VAASGNSGAGS,  
30 GSISYPARYANAM, ISYPARYANAMAV, YPARYANAMAVGA, ARYANAMAVGATD,  
NAMAVGATDQNNN, MAVGATDQNNNRA, AVGATDQNNNRA, NNRASFSQYGAGL,  
RASFSQYGAGLDI, ASFSQYGAGLDIV, SQYGAGLDIVAPG, GAGLDIVAPGVNV,  
35 AGLDIVAPGVNVQ, LDIVAPGVNVQST, DIVAPGVNVQSTY, APGVNVQSTYPGS,  
PGNVNVQSTYPGST, VNVQSTYPGSTYA, STYPGSTYASLNG, STYASLNGTSMAT,  
ASLNGTSMATPHV, NGTSMATPHVAGA, MATPHVAGAAALV, TSMATPHVAGAAA,  
40 PHVAGAAALVKQK, AALVKQKNPSWSN, ALVKQKNPSWSNV, PSWSNVQIRNHLK,  
WSNVQIRNHLKNT, SNVQIRNHLKNTA, VQIRNHLKNTATS, QIRNHLKNTATSL,  
RNHLKNTATSLGS, NHLKNTATSLGST, HLKNTATSLGSTN, ATSLGSTNLYGSG,  
45 TSLGSTNLYGSL, LGSTNLYGSLVN, TNLYGSLVNAEA, NLYGSLVNAEAA,  
LYGSLVNAEAAT,

50

55

60

65

## ES 2 309 167 T3

Las secuencias peptídicas de la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

```

5   QSVFYGVVSQIKAP, SVFYGVVSQIKAPA, VPYGVVSQIKAPAL, YGVVSQIKAPALHS,
    VSQIKAPALHSQG, SQIKAPALHSQGY, PALHSQGYTGSNV, QGYTGSNVKVAVI,
10  SNVKVAVIDSGID, VKVAVIDSGIDSS, KVAVIDSGIDSSH, VAVIDSGIDSSHP,
    AVIDSGIDSSHPD, VIDSGIDSSHPDL, SGIDSSHPDLKVA, DSSHPDLKVAGGA,
    SHPDLKVAGGASM, HPDLKVAGGASMV, PDLKVAGGASMVP, DLKVAGGASMVPS,
15  LKVAGGASMVPSE, GGASMVPSETNPF, ASMVPSETNPFQD, SMVPSETNPFQDN,
    NPFQDNNSHGTHV, FQDNNSHGTHVAG, SHGTHVAGTVAAL, HGTHVAGTVAALN,
    THVAGTVAALNNS, AGTVAALNNSIGV, GTVAALNNSIGVL, AALNNSIGVLGVA,
    ALNNSIGVLGVAP, NNSIGVLGVAPSA, NSIGVLGVAPSAS, SIGVLGVAPSASL,
20  IGVLGVAPSASLY, GVLGVAPSASLYA, LGVAPSASLYAVK, APSASLYAVKVLG,
    ASLYAVKVLGADG, SLYAVKVLGADGS, YAVKVLGADGSGQ, VKVLGADGSGQYS,
    KVLGADGSGQYSW, ADGSGQYSWIING, GQYSWIINGIEWA, YSWIINGIEWAIA,
25  SWIINGIEWAIA, WIINGIEWAIAANN, NGIEWAIAANNMDV, IEWAIAANNMDVIN,
    WAIANNMDVINMS, ANNMDVINMSLGG, NNMDVINMSLGGP, MDVINMSLGGPSG,
    DVINMSLGGPSGS, INMSLGGPSGSAA, MSLGGPSGSAAK, AALKAADVKAAS,
30  ALKAADVKAASG, AADVKAASGVVV, ADVKAASGVVVV, KAVASGVVVVAAA,
    SGVVVVAAAGNEG, GVVVVAAAGNEG, VVVVAAAGNEGTS, VVVAAAGNEGTS,
    AAAGNEGTS, SSTVGYPGKYPSV, STVGYPGKYPSVI, VGYPGKYPSVIAV,
35  GKYPYPSVIAV, PSVIAVGAVDSSN, SVIAVGAVDSSNQ, IAVGAVDSSNQRA,
    GAVDSSNQRAFS, VDSSNQRAFS, ASFSSVGPELDVM, SSVGPELDVMAPG,
    GPELDVMAPGVSI, PELDVMAPGVSIQ, ELDVMAPGVSIQS, LDVMAPGVSIQST,
40  DVMAPGVSIQSTL, APGVSIQSTLPGN, PGVSIQSTLPGNK, VSIQSTLPGNKYG,
    STLPGNKYGAYNG, GNKYGAYNGTSMAS, NKYGAYNGTSMAS, GAYNGTSMASPHV,
    YNGTSMASPHVAG, TSMASPHVAGAAA, MASPHVAGAAALI, PHVAGAAALILSK,
45  AAALILSKHPNWT, AALILSKHPNWTN, ALILSKHPNWTNT, LILSKHPNWTNTQ,
    PNWTNTQVRSSLE, TQVRSSLENTTTK, QVRSSLENTTTKL, VRSSLENTTTKL,
    SSLENTTTKL, TKLGDSFYFGKGL, LGDSFYFGKGLIN, DSFYFGKGLINVQ,
50  SFYFGKGLINVQA, FFGKGLINVQAA, YFGKGLINVQAAA

```

Las secuencias peptídicas de subtilisina en *B. subtilis* con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

```

60  QSVFYGISQIKAP, SVFYGISQIKAPA, VPYFYGISQIKAPAL, YFYGISQIKAPALHS,
    ISQIKAPALHSQG, SQIKAPALHSQGY, PALHSQGYTGSNV, QGYTGSNVKVAVI,
    SNVKVAVIDSGID, VKVAVIDSGIDSS, KVAVIDSGIDSSH, VAVIDSGIDSSHP,

```

65

## ES 2 309 167 T3

AVIDSGIDSSHPD, VIDSGIDSSHPDL, SGIDSSHPDLNVR, DSSHPDLNVRGGA,  
 HPDLNVRGGASFV, PDLNVRGGASFVP, DLNVRGGASFVPS, LNVRRGGASFVPSE,  
 5 GGASFVPSETNPY, ASFVPSETNPYQD, SFVPSETNPYQDG, NPYQDGGSHGTHV,  
 SHGTHVAGTIAAL, HGTHVAGTIAALN, THVAGTIAALNNS, AGTIAALNNSIGV,  
 GTIAALNNSIGVL, AALNNSIGVLGVS, ALNNSIGVLGVSP, NNSIGVLGVSPSA,  
 10 NSIGVLGVSPSAS, IGVLGVSPPSASLY, GVLGVSPSASLYA, LGVSPSASLYAVK,  
 SPSASLYAVKVLD, ASLYAVKVLDSTG, YAVKVLDSTGSGQ, VKVLDSTGSGQYS,  
 KVLDSTGSGQYSW, STGSGQYSWIING, QQYSWIINGIEWA, YSWIINGIEWAIS,  
 15 SWIINGIEWAISN, WIINGIEWAISNN, NGIEWAISNNMDV, IEWISNNMDVIN,  
 WAISNNMDVINMS, SNNMDVINMSLGG, NNMDVINMSLGGP, MDVINMSLGGPTG,  
 DVINMSLGGPTGS, INMSLGGPTGSTA, MSLGGPTGSTALK, TALKTVVDKAVSS,  
 20 ALKTVVDKAVSSG, KTVVDKAVSSGIV, TVVDKAVSSGIVV, VVDKAVSSGIVVA,  
 KAVSSGIVVAAAA, VSSGIVVAAAAAGN, SGIVVAAAAAGNEG, GIVVAAAAAGNEGS,  
 IVVAAAAAGNEGSS, VVAAAAAGNEGSSG, AAAGNEGSSGSTS, TSTVGYPKYPST,  
 25 STVGYPKYPSTI, VGYPKYPSTIAV, AKYPSTIAVGAVN, PSTIAVGAVNSSN,  
 STIAVGAVNSSNQ, TIAVGAVNSSNQ, IAVGAVNSSNQRA, GAVNSSNQRASFS,  
 VNSSNQRASFS, NQRASFSSAGSEL, ASFSSAGSELDVM, GSELDVMAPGVSI,  
 30 ELDVMAPGVSIQS, SELDVMAPGVSIQ, LDVMAPGVSIQST, DVMAPGVSIQSTL,  
 APGVSIQSTLPGG, PGVSIQSTLPGGT, VSIQSTLPGGTYG, STLPGGTYGAYNG,  
 GGTYGAYNGTSM, GTYGAYNGTSMAT, GAYNGTSMATPHV, YNGTSMATPHVAG,  
 35 TSMATPHVAGAAA, MATPHVAGAAALI, PHVAGAAALILSK, GAAALILSKHPTW,  
 AALILSKHPTWTN, ALILSKHPTWTNA, LILSKHPTWTNAQ, PTWTNAQVRDRLE,  
 AQVRDRLESTATY, QVRDRLESTATYL, DRLESTATYLGNS, ATYLGNSFYKGK,  
 40 TYLGNSFYKGKGL, LGNSFYKGKGLIN, NSFYKGKGLINVQ, SFYKGKGLINVQA,  
 FYYKGKGLINVQAA, YYKGKGLINVQAAA

45 Las secuencias peptídicas de subtilisina en *B. licheniformis* con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

50 QTVPYGIPLIKAD, VPYGIPLIKADKV, YGIPLIKADKVQA, IPLIKADKVQAQG,  
 PLIKADKVQAQGF, IKADKVQAQGFKG, DKVQAQGFKGANV, QGFKGANVKVAVL,  
 ANVKVAVLDTGIQ, VKVAVLDTGIQAS, KAVLDTGIQASH, VAVLDTGIQASHP,  
 55 AVLDTGIQASHPD, VLDGTGIQASHPD, DTGIQASHPDNLV, TGIQASHPDNLVV,  
 QASHPDNLVVGGA, HPDLNVVGASPV, PDLNVVGASPV, DLNVVGASPVAG,  
 LNVVGASPVAGE, NVVGASPVAGEA, ASPVAGEAYNTDG, SPVAGEAYNTDGN,  
 60 EAYNTDGNHGHGTH, GHGTHVAGTVAAL, HGTHVAGTVAALD, THVAGTVAALDNT,  
 GTVAALDNTTGV, TVAALDNTTGV, AALDNTTGV, DNTTGV, LGVAPSV,  
 TTVLGVAPSVSL, TTVLGVAPSVSLY, GVLGVAPSVSLYA, LGVAPSVSLYAVK,  
 65 APSVSLYAVKVLN, PSVSLYAVKVLNS, VSLYAVKVLNSSG, SLYAVKVLNSSGS,  
 YAVKVLNSSGS, VKVLNSSGS, KVLNSSGS, GSYSGIVSGIEWA,

## ES 2 309 167 T3

TNGMDVINMSLGG, NGMDVINMSLGG, MDVINMSLGGASG, DVINMSLGGASGS,  
 INMSLGGASGSTA, MSLGGASGSTAMK, TAMKQAVDNAYAR, AMKQAVDNAYARG,  
 5 QAVDNAYARGVVV, NAYARGVVVAAA, RGVVVVAAAGNSG, GVVVVAAAGNSGN,  
 VVVVAAAGNSGNS, VVVAAAGNSGNSG, NTIGYPAKYDSVI, IGYPAKYDSVIAV,  
 AKYDSVIAVGAVD, DSVIAVGAVDSNS, SVIAVGAVDSNSN, IAVGAVDSNSNRA,  
 10 AVGAVDSNSNRAS, GAVDSNSNRASF, AVDSNSNRASFSS, SNRASFSSVGAEL,  
 ASFSSVGAELV, SSVGAELVMAPG, GAELEVMAPGAGV, AELEVMAPGAGVY,  
 ELEVMAPGAGVYS, LEVMAPGAGVYST, EVMAPGAGVYSTY, APGAGVYSTYPTN,  
 15 AGVYSTYPTNTYA, GVYSTYPTNTYAT, STYPTNTYATLNG, NTYATLNGTSMAS,  
 ATLNGTSMASPHV, LNGTSMASPHVAG, TSMASPHVAGAAA, MASPHEVAGAAALI,  
 PHVAGAAALILSK, GAAALILSKHPNL, AALILSKHPNLSA, ALILSKHPNLSAS,  
 20 LILSKHPNLSASQ, SKHPNLSASQVRN, HPNLSASQVRNRL, PNLASQVRNRLS,  
 LSASQVRNRLSST, SQVRNRLSSTATY, QVRNRLSSTATYL, NRLSSTATYLGSS,  
 ATYLGSSFFYYGKG, TYLGSSFFYYGKGL, LGSSFFYYGKGLIN, SSFFYYGKGLINVE,  
 25 SFFYYGKGLINVEA, FYYGKGLINVEAA, YYGKGLINVEAAA

### Ejemplo 15

#### Ligandos de CNTF

La presente invención proporciona formas modificadas de las subunidades proteicas que comprenden un ligando heterodimérico del complejo receptor del factor neurotrófico ciliar (CNTF) en humanos. El complejo receptor se activa mediante al menos dos ligandos, que incluyen CNTF y un complejo heterodimérico que comprende la citocina similar a cardiotrofina (CLC) y el receptor soluble del factor similar a citocina de tipo 1 (CLF) [Elson G.C.A. y col. (2000) *Nature Neuroscience* 3: 867-872]. CLC es una proteína de la familia de citocinas de IL-6 y también se conoce como nueva neurotrofina 1-factor estimulante de células B de tipo 3 [Senaldi, G. y col. (1999) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96: 11458-11463 y documento US 5.741.772]. CLF es homólogo a proteínas de la familia de receptores de citocinas de tipo I [Elson, G.C.A. y col. (1998) *Journal of Immunol.* 161: 1371-1379] y también ha sido identificado como NR6 [Alexander W.S. y col. (1999) *Curr. Biol.* 9: 605-608]. Se ha demostrado que los heterodímeros formados por la asociación de CLC y CLF interaccionan directamente con CNTFR y el complejo trimérico formado de este modo es capaz de estimular acontecimientos de señalización dentro de las células que expresan los demás componentes reconocidos del complejo CNTFR, como gp130 y LIFR [Elson G.C.A. y col. (2000) *ibid.*].

## ES 2 309 167 T3

Las secuencias peptídicas de la CLC humana con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

5 PGPSIQKTYDLTR, PSIQKTYDLTRYL, IQKTYDLTRYLEH, KTYDLTRYLEHQL,  
 YDLTRYLEHQLRS, LTRYLEHQLRSLA, TRYLEHQLRSLAG, RYLEHQLRSLAGT,  
 HQLRSLAGTYLNY, QLRSLAGTYLNYL, RSLAGTYLNYLGP, GTYLNLYGPPFNE,  
 TYLNLYGPPFNEP, NYLGPPFNEPDFN, PPFNEPDFNPPRL, PFNEPDFNPPRLG,  
 10 PDFNPPRLGAETL, FNPPRLGAETLPR, PRLGAETLPRATV, LGAETLPRATVDL,  
 ETLPRATVDLEVW, PRATVDLEVWRSL, ATVDLEVWRSLND, TVDLEVWRSLNDK,  
 VDLEVWRSLNDKL, LEVWRSLNDKLRL, EVWRSLNDKLRLT, VWRSLNDKLRLTQ,  
 15 RSLNDKLRLTQNY, DKLRLTQNYEAYS, KLRLTQNYEAYSH, LRLTQNYEAYSHL,  
 TQNYEAYSHLLCY, QNYEAYSHLLCYL, EAYSHLLCYLRGL, SHLLCYLRGLNRQ,  
 HLLCYLRGLNRQA, LCYLRGLNRQAAT, CYLRGLNRQAATA, RGLNRQAATAELR,  
 20 GLNRQAATAELRR, QAATAELRRSLAH, AATAELRRSLAHF, AELRRSLAHFCTS,  
 ELRRSLAHFCTSL, RSLAHFCTSLQGL, AHFCTSLQGLLGS, TSLQGLLGSIAGV,  
 SLQGLLGSIAGVM, QGLLGSIAGVMAA, GLLGSIAGVMAAL, LLGSIAGVMAALG,  
 25 GSIAGVMAALGYP, SIAGVMAALGYPL, AGVMAALGYPLPQ, GVMAALGYPLPQP,  
 AALGYPLPQPLPG, LGYPLPQPLPGTE, YPLPQPLPGTEPT, QPLPGTEPTWTPG,  
 PTWTPGPAHSDFL, WTPGPAHSDFLQK, HSDFLQKMDDFWL, SDFLQKMDDFWLL,  
 30 DFLQKMDDFWLLK, FLQKMDDFWLLKE, QKMDDFWLLKELQ, DDFWLLKELQTWL,  
 DFWLLKELQTWLW, FWLLKELQTWLWR, WLLKELQTWLWRS, KELQTWLWRS AKD,  
 ELQTWLWRS AKDF, QTWLWRS AKDFNR, TWLWRS AKDFNRL, WLWRS AKDFNRLK,  
 35 WRS AKDFNRLKKK, RSAKDFNRLKKKM, KDFNRLKKKMOPP, NRLKKKMOPPAAA,  
 RLKKKMOPPAAAV, LKKKMOPPAAAVT, KKMOPPAAAVTLH, KMOPPAAAVTLHL,  
 QPPAAAVTLHLGA  
 40

Las secuencias peptídicas del CLF humano con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

45 TAVISQDPTLLI, AVISQDPTLLIG, VISQDPTLLIGS, QDPTLLIGSSLLA,  
 DPTLLIGSSLLAT, PTLIGSSLLATC, TLLIGSSLLATCS, LLIGSSLLATCSV,  
 IGSSLLATCSVHG, SSLATCSVHGDP, SLLATCSVHGDP, CSVHGDPGATAE,  
 50 GDPPGATAEGLYW, EGLYWTNLGRRLP, GLYWTNLGRRLPP, WTLNRRLLPPELS,  
 RRLPPELSRVLNA, RLPPELSRVLNAS, PELSRVLNASTLA, ELSRVLNASTLAL,  
 LSRVLNASTLALA, SRVLNASTLALAL, RVLNASTLALALA, LNASTLALALANL,  
 55 NASTLALALANLN, STLALALANLNGS, LALALANLNGSRQ, LALANLNGSRQRS,  
 ANLNGSRQRSGDN, DNLVCHARDGSIL, NLVCHARDGSILA, VCHARDGSILAGS,  
 RDGSILAGSCLYV, DGSILAGSCLYVG, GSILAGSCLYVGL, SILAGSCLYVGLP,  
 60 SCLYVGLPPEKPV, CLYVGLPPEKPVN, LYVGLPPEKPVNI, VGLPPEKPVNISC,  
 KPVNISCWSKNMK, VNISCWSKNMKDL, KNMKDLTCRWTPG, KDLTCRWTPGAHG,  
 CRWTPGAHGETFL, RWTPGAHGETFLH, HGETFLHTNYSK, ETFLHTNYSKYL,  
 65 TFLHTNYSKYLK, TNYSKYLKRWYG, YSLKYLKRWYGQD, LKYLKRWYGQDNT,

YKLRWYGQDNTCE, LRWYGQDNTCEEY, RWYGQDNTCEEYH, EEYHTVGPCHSCHI,  
 HTVGPCHSCHIPKD, PHSCHIPKDLALF, CHIPKDLALFTPY, IPKDLALFTPYEI,  
 5 KDLALFTPYEIVW, ALFTPYEIVWEAT, TPYEIVWEATNRL, YEIVWEATNRLGS,  
 EIWVEATNRLGSA, IWVEATNRLGSAR, EIWVEATNRLGSA, NRLGSARSVDLTL,  
 EATNRLGSARSVD, SARSVDLTLDILD, SDVLTLDILDVVT, DVLTLTDILDVVT,  
 10 LTLTDILDVVTDDP, LDILDVVTDDPPP, DILDVVTDDPPPD, LDVVTDDPPPDVH,  
 ARSDVLTLDILDV, PDVHVS RVGGLED, VHSRVGGLEDQL, SRVGGLEDQLSVR,  
 DVVTDDPPPDVHV, GGLEDQLSVRWVS, RVGGLEDQLSVRW, DQLSVRWVSPPAL,  
 15 LSVRWVSPPALKD, VRWVSPPALKDFL, RWVSPPALKDFLF, GLEDQLSVRWVSP,  
 PALKDFLFQAKYQ, KDFLFQAKYQIRY, DFLFQAKYQIRYR, FLFQAKYQIRYRV,  
 VSPPALKDFLFQA, AKYQIRYRVEDSV, YQIRYRVEDSVDW, IRYRVEDSVDWKV,  
 20 YRVEDSVDWKVVD, FQAKYQIRYRVED, DSVDWKVVDDVSN, VDWKVDDVSNQT,  
 VEDSVDWKVVDDV, KVVDDVSNQTSCR, DDVSNQTSCRLAG, WKVVDDVSNQTSC,  
 QTSCRLAGLKPGT, CRLAGLKPGTVYF, AGLKPGTVYFVQV, GTVYFVQVRCNPF,  
 25 TVYFVQVRCNPF, VYFVQVRCNPF, FVQVRCNPF, VQVRCNPF, NPF, GSKKAGI,  
 NPF, GSKKAGI, FGIY, GSKKAGI, GSKKAGI, GSKKAGI, GSKKAGI, GSKKAGI,  
 SKKAGI, SEWSHPTAA, GIWSEWSHPTAA, SEWSHPTAA, SHPTAA, SHPTAA,  
 30 SHPTAA, SHPTAA, SHPTAA, SHPTAA, SHPTAA, SHPTAA, SHPTAA, SHPTAA,  
 KQFLGWLKKHAYC, QFLGWLKKHAYCS, LGWLKKHAYCSNL, GWLKKHAYCSNLS,  
 HAYCSNLSFRLYD, AYCSNLSFRLYDQ, SNLSFRLYDQWRA, LSFRLYDQWRAWM,  
 35 FRLYDQWRAWMQK, RLYDQWRAWMQKS, DQWRAWMQKSHKT, RAWMQKSHKTRNQ,  
 AWMQKSHKTRNQD, HKTRNQDEGILPS, EGILPSGRRGTAR, GILPSGRRGTARG

## Ejemplo 16

*Hormona folículo estimulante*

La presente invención proporciona formas modificadas de la hormona folículo estimulante humana (hFSH) con uno o más epítopes de células T eliminados. La hFSH es una hormona glucoproteica con estructura dimérica que contiene dos subunidades glucoproteicas. La proteína se está utilizando terapéuticamente en el tratamiento de la infertilidad humana y una forma recombinante de la misma ha sido objeto de varios ensayos clínicos [Out, H.J. y col. (1995) *Hum. Reprod.* 10: 2534-2540; Hedon, B. y col (1995) *Hum. Reprod.* 10: 3102-3106; Recombinant Human FSH study Group (1995) *Fertil. Steril.* 63:77-86; Prevost, R.R. (1998) *Pharmacotherapy* 18: 1001-1010].

Las secuencias peptídicas de la hFSH humana con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

KTLQFFFLFCCWK, LQFFFLFCCWKAI, QFFFLFCCWKAIC, FFFFLFCCWKAICC,  
 55 FFFFLFCCWKAICCN, FLFCCWKAICNS, CCWKAICCNSEL, KAICCNSELNLI,  
 CELTNITIAIEKE, TNITIAIEKEECR, ITIAIEKEECRFC, IAIEKEECRFCIS,  
 CRFCISINTTWCAGY, FCISINTTWCAGY, ISINTTWCAGYCY, TTWCAGYCYTRDL,  
 60 AGYCYTRDLVYKD, YCYTRDLVYKDPA, RDLVYKDPAKPKI, DLVYKDPAKPKIQ,  
 LVYKDPAKPKIQK, PKIQKTCTFKELV, CTFKELVYETVRV, KELVYETVRVPGC,  
 ELVYETVRVPGCA, LVYETVRVPGCAH, ETVRVPGCAHHA, VRVPGCAHHAH,  
 65 DSLYTPVATQCH, SLYTPVATQCHC, YTPVATQCHCGK, YPVATQCHCGKCD,  
 CTVRGLGPSYCSF, RGLGPSYCSFGEM

## Ejemplo 16

*Ricina A*

La presente invención proporciona formas modificadas de la cadena A de la toxina ricina (RTA) con uno o más epítopes de células T eliminados. La ricina es una citotoxina aislada originalmente de las semillas de la planta del ricino y es un ejemplo de proteína inactivadora de ribosomas de tipo II (RIP). La proteína madura nativa es un heterodímero que comprende la RTA de 267 restos aminoácidos unida mediante puentes disulfuros con la cadena B de la ricina de 262 restos de aminoácidos. La cadena B es una lectina con afinidad de unión a galactósidos. La proteína nativa es capaz de unirse a células a través de la cadena B y de entrar en la célula por endocitosis. Dentro de la célula, la RTA se libera de la cadena B por reducción del puente disulfuro y es liberada desde el endosoma al citoplasma mediante mecanismos desconocidos. En el citoplasma, la toxina degrada los ribosomas mediante una acción N-glucosilasa específica que rápidamente da lugar al cese de la traducción de proteínas y a la muerte celular. La extrema citotoxicidad de la RTA y de otras RIP ha llevado a su uso en terapias experimentales para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades donde es necesaria la eliminación de una población celular en particular. Se han producido moléculas de inmunotoxinas que contienen moléculas de anticuerpo unidas a RTA y se han usado en varios ensayos clínicos [Ghetie, M.A. y col. (1991) *Cancer Res.* 51: 5876-5880; Vitetta, E.S. y col. (1991) *Cancer Res.* 51: 4052-4058; Amlot, P.L. y col. (1993) *Blood* 82: 2624-2633; Conry, R.M. y col. (1995) *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 18: 231-241; Schnell, R. y col (2000) *Leukaemia* 14: 129-135]. En la inmunotoxina, el dominio del anticuerpo proporciona la unión a la superficie de la célula diana deseada y la unión con la RTA puede realizarse a través de entrecruzamiento químico o como una proteína de fusión recombinante.

Las secuencias peptídicas de la cadena A de la toxina ricina con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

KQYPIINFTTAGA, YPIINFTTAGATV, PIINFTTAGATVQ, INFTTAGATVQSY,  
 ATVQSYTNFIRAV, QSYTNFIRAVRGR, TNFIRAVRGRLLT, NFIRAVRGRLLTG,  
 RAVRGRLLTGADV, GRLTTGADV RHEI, ADV RHEIPVLPNR, HEIPVLPNRVGLP,  
 IPVLPNRVGLPIN, PVL PNRVGLPINQ, NRVGLPINQRFIL, VGLPINQRFILVE,  
 LPINQRFILVELS, QRFILVELSNHAE, RFILVELSNHAEL, FILVELSNHAEELS,  
 ILVELSNHAEELSV, VELSNHAEELSVTL, AEELSVTLALDVTN, LSVTLALDVTNAY,  
 VTLALDVTNAYVV, LALDVTNAYVVG, LDVTNAYVVG, NAYVVG, YRAGNSA,  
 AYVVG, YRAGNSAY, YVVG, YRAGNSAYF, VYRAGNSAYFFH, SAYFFH, PDNQEDA,  
 AYFFH, PDNQEDAE, YFFH, PDNQEDAE, EAITHLFTDVQNR, THLFTDVQNR, YTF,  
 HLFTDVQNR, YTF, TDVQNR, YTF, AF, G, NRYTF, AF, G, NYDR, YTF, AF, G, NYDRLE,  
 FAF, G, NYDRLE, QL, G, NYDRLE, QL, AGNL, DRLE, QL, AGNL, REN, E, QL, AGNL, REN, IEL,  
 GNL, REN, IEL, G, NP, ENIEL, G, NP, LEEA, IEL, G, NP, LEEA, IS, GPL, EEA, IS, SAL, YYY,  
 EAISAL, YYY, STGG, SAL, YYY, STGG, TQL, AL, YYY, STGG, TQL, P, L, YYY, STGG, TQL, P, T,  
 YYY, STGG, TQL, P, T, L, TQL, P, T, LARSFIIC, P, T, LARSFIIC, IQM, RSFIIC, IQM, ISEA,  
 SFIIC, IQM, ISEA, A, FIIC, IQM, ISEA, A, R, IC, IQM, ISEA, A, R, FQ, IQM, ISEA, A, R, FQ, YI,  
 QM, ISEA, A, R, FQ, YI, E, AR, FQ, YI, E, GEM, R, TR, FQ, YI, E, GEM, R, TR, I, R, QYI, E, GEM, R, TR, I, R, Y,  
 GEM, R, TR, I, R, Y, N, R, R, S, TRI, R, Y, N, R, R, S, A, P, D, P, I, R, Y, N, R, R, S, A, P, D, P, S, V, P, S, V, I, T, L, E, N, S, W, G, R, L,  
 S, V, I, T, L, E, N, S, W, G, R, L, S, I, T, L, E, N, S, W, G, R, L, S, T, A, N, S, W, G, R, L, S, T, A, I, Q, E, S, G, R, L, S, T, A, I, Q, E, S, N, Q, G,  
 T, A, I, Q, E, S, N, Q, G, A, F, A, S, G, A, F, A, S, P, I, Q, L, Q, R, R, N, S, P, I, Q, L, Q, R, R, N, G, S, K, F, I, Q, L, Q, R, R, N, G, S, K, F, S, V,  
 S, K, F, S, V, Y, D, V, S, I, L, I, P, F, S, V, Y, D, V, S, I, L, I, P, I, I, S, V, Y, D, V, S, I, L, I, P, I, I, A, Y, D, V, S, I, L, I, P, I, I, A, L, M,  
 V, S, I, L, I, P, I, I, A, L, M, V, Y, S, I, L, I, P, I, I, A, L, M, V, Y, R, I, P, I, I, A, L, M, V, Y, R, C, A, P, I, A, L, M, V, Y, R, C, A, P, P, P, S,  
 A, L, M, V, Y, R, C, A, P, P, P, S, S, L, M, V, Y, R, C, A, P, P, P, S, S, Q, M, V, Y, R, C, A, P, P, P, S, S, Q, F

### Ejemplo 17

*Proteína de adipocitos relacionada con complemento*

La presente invención proporciona formas modificadas de Acrp30 humana o de ratón con uno o más epítopes de células T eliminados. Acrp30 es una proteína sérica abundante de aproximadamente 30 kDa de peso molecular que se expresa exclusivamente en adipocitos [Scherer, P.E. y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 26746-26749]. La secuencia del gen de la proteína Acrp30 humana se describe, por ejemplo en el documento US 5.869.330. La insulina potencia la secreción de la proteína y los niveles de la proteína disminuyen en sujetos obesos. La proteína está implicada en la regulación del balance energético y, en particular, en la regulación del metabolismo de ácidos grasos. En las proteínas de ratón y humana se han identificado cuatro dominios de secuencia que comprenden una señal de escisión N-terminal, una región sin homología reconocida con otras proteínas, un dominio similar a colágeno y un dominio globular. El dominio globular puede eliminarse de la proteína de ratón mediante tratamiento con proteasa para producir la gAcrp30. Las preparaciones de gAcrp30 murina tienen propiedades farmacéuticas y se ha demostrado que disminuyen los niveles elevados de ácidos grasos libres en el suero de los ratones tras la administración de comidas ricas en grasa o inyección i.v. de lípidos [Fruebis, J. y col. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 2005-2010].

Las secuencias peptídicas de la Acrp30 de ratón con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

|    |                 |                 |                 |                 |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 20 | DDVTTTTEELAPAL, | TTTEELAPALVPP,  | EELAPALVPPPKG,  | LAPALVPPPKGTC,  |
|    | PALVPPPKGTCAG,  | ALVPPPKGTCAGW,  | AGWMAGIPGHPGH,  | GWMAGIPGHPGHN,  |
|    | AGIPGHPGHNGTP,  | GTPGRDGRDGTGP,  | GDAGLLGPKGETG,  | AGLLGPKGETGDV,  |
| 25 | GLLGPKGETGDVG,  | GETGDVGMTGAEG,  | GDVGMTGAEGPRG,  | VGMTGAEGPRGFP   |
|    | RGFPGTPGRKGEP,  | TPGRKGEPGEAAY,  | GRKGEPGEAAYMY,  | AAYMYRSAFSVGL,  |
|    | AYMYRSAFSVGLE,  | YMYRSAFSVGLET,  | SAFSVGLETRVTV,  | FSVGLETRVTVPN,  |
| 30 | VGLETRVTVPNVP,  | GLETRVTVPNVPI,  | ETRVTVPNVPIRF,  | TRVTVPNVPIRFT,  |
|    | VTVPNVPIRFTKI,  | VPNVPIRFTKIFY,  | PNVPIRFTKIFYN,  | VPIRFTKIFYNQQ,  |
|    | IRFTKIFYNQNH,   | RFTKIFYNQNHY,   | TKIFYNQNHYDG,   | KIFYNQNHYDGS,   |
| 35 | IFYNQNHYDGST,   | QQNHYDGSTGKFY,  | NHYDGSTGKFYCN,  | GKFYCNIPGLYYF,  |
|    | KFYCNIPGLYYFS,  | CNIPGLYYFSYHI,  | PGLYYFSYHITVY,  | GLYYFSYHITVYM,  |
|    | LYYFSYHITVYMK,  | YYFSYHITVYMKD,  | FSYHITVYMKDVK,  | SYHITVYMKDVKV,  |
| 40 | YHITVYMKDVKVS,  | HITVYMKDVKVSL,  | ITVYMKDVKVSLF,  | TVYMKDVKVSLFK,  |
|    | VYMKDVKVSLFVK,  | KDVKVSFLFKDKA,  | VKVSLFKDKKAVL,  | VSLFKDKKAVLFT,  |
|    | SLFKDKKAVLFTY,  | FKDKKAVLFTYDQ,  | KDKAVLFTYDQYQ,  | KAVLFTYDQYQEK,  |
|    | AVLFTYDQYQEKN,  | VLFTYDQYQEKNV,  | FTYDQYQEKNVDQ,  | YDQYQEKNVDQAS,  |
| 45 | DQYQEKNVDQASG,  | EKNVDQASGSVLL,  | KNVDQASGSVLLH,  | ASGSVLLHLEVG D, |
|    | GSVLLHLEVG DQV, | SVLLHLEVG DQVW, | VLLHLEVG DQVWL, | LHLEVG DQVWLQV, |
|    | LEVGDQVWLQVYG,  | DQVWLQVYGDGDH,  | QVWLQVYGDGDHN,  | VWLQVYGDGDHNG,  |
| 50 | LQVYGDGDHNGLY,  | QVYGDGDHNGLYA,  | VYGDGDHNGLYAD,  | GDHNGLYADNVND,  |
|    | NGLYADNVNDSTF,  | GLYADNVNDSTFT,  | LYADNVNDSTFTG,  | DNVNDSTFTGFL L, |
|    | VNDSTFTGFLLYH,  | STFTGFLLYHDTN   |                 |                 |

Las secuencias peptídicas de la Acrp30 humana con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

PGVLLPLPKGACT, GVLLPLPKGACTG, VLLPLPKGACTGW, LPLPKGACTGWMAG,  
PLPKGACTGWMAG, TGWMAGIPGHPGH, GWMAGIPGHPGHN, AGIPGHPGHNGAP,  
60 GAPGRDGRDGTTPG, GDPGLIGPKGDIG, PGLIGPKGDIGET, GLIGPKGDIGETG,  
GPKGDIGETGVPG, GDIGETGVPGAEG, TGVPGAEGPRGFP, RGFPPIQGRKGEP,  
PGIQGRKGEPGEG, GRKGEPGEGAYVY, GAYVYRSAFSVGL, AYVYRSAFSVGLE,  
65 YVYRSAFSVGLET, RSAFSVGLETYVT, SAFSVGLETYVTI, AFSVGLETYVTIP,  
FSVGLETYVTIPN, VGLETYVTIPNMP, GLETYVTIPNMPI, ETYVTIPNMPIRF,

## ES 2 309 167 T3

TYVTIPNMPIRFT, VTIPNMPIRFTKI, IPNMPIRFTKIFY, PNMPIRFTKIFYN,  
 MPIRFTKIFYNQ, IRFTKIFYNQNH, RFTKIFYNQNH, TKIFYNQNH, YD,  
 KIFYNQNH, YD, GST, QNH, YD, GST, KFH, N, YD, GST, KFH, CN,  
 5 GKFHCNIPGLYYF, CNIPGLYYFAYHI, PGLYYFAYHITVY, GLYYFAYHITVYM,  
 LYYFAYHITVYMK, YYFAYHITVYMKD, FAYHITVYMKDVK, AYHITVYMKDVKV,  
 YHITVYMKDVKVS, HITVYMKDVKVSL, ITVYMKDVKVSLF, TVYMKDVKVSLFK,  
 10 VYMKDVKVSLFKK, KDVKVSFLFKKDKA, VKVSLFKKDKAML, VSLFKKDKAMLFT,  
 SLFKKDKAMLFTY, FKKDKAMLFTYDQ, KDKAMLFTYDQYQ, KAMLFTYDQYQEN,  
 AMLFTYDQYQENN, MLFTYDQYQENNV, FTYDQYQENNV, YDQYQENNV, QAS,  
 15 DQYQENNV, QAS, G, ENNV, QAS, G, VLL, NN, V, QAS, G, VLL, H, AS, G, VLL, H, LE, V, G, D,  
 GSVLLHLEVG, DQV, SVLLHLEVG, DQV, V, VLLHLEVG, DQV, W, LHLEVG, DQV, W, LQV,  
 LEVG, DQV, W, LQV, Y, G, DQV, W, LQV, Y, G, G, QV, W, LQV, Y, G, G, E, R, N, V, W, LQV, Y, G, G, E, R, N, G,  
 20 LQV, Y, G, G, E, R, N, G, L, Y, QV, Y, G, G, E, R, N, G, L, Y, A, N, G, L, Y, A, D, N, D, N, D, S, T, F, T, G, L, Y, A, D, N, D, N, D, S, T, F, T, G,  
 LYADNDNDSTFTG, DNDSTFTGFLLYH, STFTGFLLYHDTN.

### Ejemplo 18

#### Anticuerpo anti-C5

La presente invención proporciona formas modificadas de anticuerpos monoclonales con especificidad de unión dirigida hacia la proteína C5 del complemento humano. La invención proporciona anticuerpos modificados con uno o más epítopes de células T eliminados. Los anticuerpos con especificidad de unión por la proteína del complemento C5 bloquean la activación de escisión de la C5 convertasa y inhibe de este modo la producción de los componentes proinflamatorios C5a y C5b-9. La activación del sistema de complemento es un factor importante que contribuye a la patogénesis de varias enfermedades agudas, y crónicas e la inhibición de la cascada del complemento a nivel de C5 es significativamente prometedora como una vía terapéutica para algunas de ellas [Morgan B.P. (1994) *Eur. J. Clin. Invest.* 24: 219-228]. Se han descrito en la técnica varios anticuerpos anti-C5 y métodos para su uso terapéutico [Wurzner R. y col. (1991) *Complement Inflamm.* 8: 328-340; Thomas, T.C. y col. (1996) *Molecular Immunology* 33: 1389-14012, documentos US 5.853.722 y US 6.074.64]. El anticuerpo denominado 5G1.1 [Thomas, T.C. y col. (1996) *ibid*] y una variante de cadena sencilla humanizada se están sometiendo a ensayos clínicos para varias indicaciones de enfermedades que incluyen derivación cardiopulmonar [Fitch, J.C.K. y col. (1999) *Circulation* 100: 2499-2506] y artritis reumatoide. La invención describe secuencias identificadas en el anticuerpo anti-C5 denominadas 5G1-1 [Thomas, T.C. y col.]. Las secuencias descritas derivan de los dominios de la región variable tanto de las cadenas pesadas como ligeras de la secuencia del anticuerpo que son posibles epítopes de las células T en virtud de su posible unión a moléculas MHC de clase II. La descripción además identifica posibles epítopes en la secuencia proteica de una variante de cadena sencilla y “humanizada” del anticuerpo 5G1.1 [Thomas, T.C. y col. (1996) *ibid*].

Las secuencias peptídicas de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 5G1.1 con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

VQLQQSGAELMKP, QSGAELMKPGASV, AELMKPGASVKMS, ELMKPGASVKMSC,  
 ASVKMSCKATGYI, VKMSCKATGYIFS, KMSCKATGYIFSN, ATGYIFSNYWIQW,  
 TGYIFSNYWIQWI, GYIFSNYWIQWIK, YIFSNYWIQWIKQ, SNYWIQWIKQRP,  
 55 NYWIQWIKQRP, GH, YWIQWIKQRP, GH, G, IQWIKQRP, GH, G, LE, QWIKQRP, GH, G, LE, W,  
 HGLEWIGEILPGS, LEWIGEILPGSGS, EWIGEILPGSGST, WIGEILPGSGSTE,  
 GEILPGSGSTEYT, EILPGSGSTEYTE, TEYTENFKDKAAF, ENFKDKAAFTADT,  
 60 FDKDKAAFTADTSS, KAAFTADTSSNTA, AFTADTSSNTAY, TAYMQLSSLTSED,  
 AYMQLSSLTSEDS, MQLSSLTSEDSAV, SSLTSEDSAVYYC, SLTSEDSAVYYCA,  
 TSEDSAVYYCARY, SAVYYCARYFFGS, AVYYCARYFFGSS, VYYCARYFFGSSP,  
 65 CARYFFGSSPNWY, ARYFFGSSPNWYF, RYFFGSSPNWYFD, YFFGSSPNWYFDV,  
 PNWYFDVWAGTT, NWYFDVWAGTTV, WYFDVWAGTTVT, FDVWAGTTVTVS,  
 DVWAGTTVTVSS

## ES 2 309 167 T3

Las secuencias peptídicas de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 5G1.1 con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

IQMTQSPASLSAS, ASLSASVGETVTI, ASVGETVTITCGA, ETVTITCGASENI,  
VTITCGASENIYG, TITCGASENIYGA, ENIYGALNWKQRK, NIYGALNWKQRKQ,  
GALNWKQRKQKGS, LNWKQRKQKSPQ, NWKQRKQKSPQL, GKSPQLLIYGATN,  
PQLLIYGATNLAD, QLLIYGATNLADG, LLIYGATNLADGM, LIYGATNLADGMS,  
TNLADGMSSRFSG, DGMSSRFSGSGSG, SRFSGSGSGRQYY, SGSGRQYYLKISS,  
RQYYLKISSLHPD, QYYLKISSLHPDD, YYLKISSLHPDDV, LKISSLHPDDVAT,  
SSLHPDDVATYYC, SLHPDDVATYYCQ, DDVATYYCQNVLN, ATYYCQNVLNTPL,  
TYYCQNVLNTPLT, YYCQNVLNTPLTF, YCQNVLNTPLTFG, CQNVLNTPLTFGA,  
QNVLNTPLTFGAG, NVLNTPLTFGAGT, TPLTFGAGTKLEL

### Ejemplo 19

#### Anticuerpos anti-CD20

La presente invención proporciona formas modificadas de un anticuerpo monoclonal con especificidad de unión por el antígeno C20 humano. El CD20 es una molécula de superficie específica de células B expresada en células pre-B y B maduras, incluyendo más del 90% de los linfomas no Hodgkin (LNH) de células B. Los anticuerpos monoclonales y los radioinmunoconjugados que tiene como objetivo CD20 han surgido como nuevos tratamientos frente al LNH. Entre los ejemplos significativos se incluyen los anticuerpos monoclonales 2B8 [Reff, M.E. y col. (1994) *Blood* 83: 435-445] y B1 [documento US 6.090.365]. Los dominios de la región variable de 2B8 se han clonado y combinado con los dominios de la región constante humana para obtener un anticuerpo quimérico denominado C2B8 que se comercializa como Rituxan<sup>TM</sup> en EE.UU. [documento US 5.776.456] o MabThera<sup>®</sup> (rituximab) en Europa. C2B8 se reconoce como un agente terapéutico valioso para el tratamiento de LNH y otras enfermedades de células B [Maloney, D.G. y col. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15: 3266-3274; Maloney, D.G. y col. (1997) *Blood* 90: 2188-2195]. El anticuerpo B1 ha conseguido un registro similar para el uso como agente terapéutico en LNH aunque, en este caso, la molécula (Bexxar<sup>TM</sup>) es un radioinmunoconjugado con <sup>131</sup>I, aunque el anticuerpo nativo (no conjugado) se utiliza en los procedimientos de purgado *ex vivo* para tratamientos con trasplante autólogo de médula ósea en linfomas y leucemias resistentes [Freedman, A.A. y col. (1990), *J. Clin. Oncol.* 8: 784]. A pesar de la eficacia de anticuerpos como C2B8 (rituximab) y Bexxar<sup>TM</sup>, existe una necesidad continua de análogos de anti-CD20 con propiedades mejoradas.

Las secuencias peptídicas de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 2B8 con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

VQLQQPGAELVKA, LQQPGAELVKAGA, AELVKAGASVKMS, ELVKAGASVKMSC,  
ASVKMSCKASGYT, VKMSCKASGYTFT, KMSCKASGYTFTS, ASGYTFTSYNMHW,  
SGYTFTSYNMHWV, YTFTSYNMHWVKQ, TSYNMHWVKQTPG, YNMHWVKQTPGRG,  
MHWVKQTPGRGLE, HWVKQTPGRGLEW, TPGRGLEWIGAIY, RGLEWIGAIYPGN,  
GLEWIGAIYPGNG, EWIGAIYPNGDT, GAIYPNGDTSYN, AIYPNGDTSYNQ,  
YPNGDTSYNQKF, TSYNQKFKGKATL, YNQKFKGKATLTA, QKFKGKATLTADK,  
ATLTADKSSSTAY, TAYMQLSSLTSED, AYMQLSSLTSEDS, MQLSSLTSEDSAV,  
SSLTSEDSAVYYC, SLTSEDSAVYYCA, TSEDSAVYYCARS, SAVYYCARSTYYG,  
AVYYCARSTYYGG, VYYCARSTYYGGD, STYYGGDTYFNVW, TYYGGDTYFNVWG,  
DITYFNVWGAGTTV, TYFNVWGAGTTVT, FNVWGAGTTVTVS, NVWGAGTTVTVSA

## ES 2 309 167 T3

Las secuencias peptídicas de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 2B8 con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

5 QIVLSQSPAILSA, IVLSQSPAILSAS, QSPAILSASPGEK, PAILSASPGEKVT,  
AILSASPGEKVTM, EKVTMTCRASSSV, VTMTCRASSSVSY, TMTCRASSSVSYI,  
SSVSYIHWFQQKP, VSYIHWFQQKPGS, SYIHWFQQKPGSS, IHWFQQKPGSSPK,  
10 KPWIYATSNLASG, PWIYATSNLASGV, WIYATSNLASGVP, ATSNLASGVPVRF,  
SNLASGVPVRFSG, SGVPVRFSGSGSG, VPVRFSGSGSGTS, VRFSGSGSGTSYS,  
GTSYSLTISRVEA, TSYSLTISRVEAE, SYSLTISRVEAED, YSLTISRVEAEDA,  
15 LTISRVEAEDAAT, SRVEAEDAATYYC, RVEAEDAATYYCQ, ATYYCQQWTSNPP,  
TYYCQQWTSNPPT, QQWTSNPPTFGGG, NPPTFGGGTKLEI

### 20 Ejemplo 20

La presente invención proporciona formas modificadas de un anticuerpo monoclonal con especificidad de unión al receptor de la IL-2 humana. El anticuerpo monoclonal se diseña como anti-Tac y la forma modificada tiene uno o más epítopes eliminados. El anticuerpo anti-Tac se une con alta especificidad a la subunidad alfa (p55-alfa, CD25 o Tac) del receptor de alta afinidad de la IL-2 humana expresado en la superficie de linfocitos T y B. La unión del anticuerpo bloquea la capacidad de IL-2 para unirse al receptor y conseguir la activación de la célula T. La capacidad del anticuerpo anti-Tac para actuar como un antagonista de IL-2 tiene potencial importancia clínica en el tratamiento del rechazo del trasplante de órganos. Los estudios clínicos que utilizan el anticuerpo de ratón han mostrado cierto beneficio inicial para los paciente que se someten a un trasplante de riñón aunque no se ha encontrado beneficio a largo plazo sobre la inmunodepresión convencional debido al desarrollo de una respuesta HAMA en una alta proporción de pacientes [Kirkman, R.L. y col. (1991) *Transplantation* 51: 107-113]. Se ha desarrollado un anticuerpo anti-Tac “humanizado” en el que los componentes significativos de la proteína se han sometido a ingeniería genética para que contengan secuencias proteicas identificadas a partir del gen de un anticuerpo humano [Queen, C. y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86: 10029-10033, documentos US 5.530.101; US 5.585.089 y US 6.013.256]. El anticuerpo anti-Tac “humanizado” (Zenapax™ o daclizumab) se está utilizado en ensayos clínicos como agente inmunodepresor para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped agudo y supresión del rechazo de trasplante de riñón [Anasetti, C. y col. (1994) *Blood* 84: 1320-1327; Anasetti, C. y col. (1995) *Blood* 86: suplemento 1:62a; Eckhoff, D.E. y col. (2000) *Transplantation* 69: 1867-1872; Ekberg, H. y col. (1999) *Transplant Proc.* 31: 267-268].

40 Las secuencias peptídicas de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Tac de ratón con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

VQLQQSGAELAKP, AELAKPGASVKMS, ASVKMSCKASGYT, VKMSCKASGYTFT,  
45 KMSCKASGYTFTS, ASGYTFTSYRMHW, SGYTFTSYRMHWV, YTFTSYRMHWVKQ,  
TSYRMHWVKQRPG, YRMHWVKQRPGQG, MHWVKQRPGQGLE, HWVKQRPGQGLEW,  
RPGQGLEWIGYIN, QGLEWIGYINPST, LEWIGYINPSTGY, EWIGYINPSTGYT,  
50 IGYINPSTGYTEY, GYINPSTGYTEYN, TGYTEYNQKFCDK, TEYNQKFCDKATL,  
QKFCDKATLTADK, ATLTADKSSSTAY, TAYMQLSSLTFED, AYMQLSSLTFEDS,  
YMQLSSLTFEDSA, MQLSSLTFEDSAV, SSLTFEDSAVYYC, SLTFEDSAVYYCA,  
55 LTFEDSAVYYCAR, SAVYYCARGGGVF, AVYYCARGGGVFD, VYYCARGGGVFDY,  
GGVFDYWGQGTTL, GVFDYWGQGTTLT, FDYWGQGTTLTVS, DYWGQGTTLTVSS

60

65

ES 2 309 167 T3

Las secuencias peptídicas de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Tac de *ratón* con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

5 QIVLTQSPAIMSA, IVLTQSPAIMSAS, QSPAIMASAPGEK, PAIMASAPGEKVT,  
AIMSASPGEKVTI, EKVTITCSASSSI, VTITCSASSSISY, TITCSASSSISYM,  
SSISYMHWFQQKP, ISYMHWFQQKPGT, SYMHWFQQKPGTS, MHWFQQKPGTSPK,  
HWFQQKPGTSPKL, SPKLWIYTTSNLA, PKLWIYTTSNLAS, KLWIYTTSNLASG,  
10 LWIYTTSNLASGV, WIYTTSNLASGVP, TTSNLASGVPARF, SNLASGVPARFSG,  
SGVPARFSGSGSG, ARFSGSGSGTSYS, GTSYSLTISRMEA, TSYSLTISRMEAE,  
SYSLTISRMEAED, YSLTISRMEAEDA, LTISRMEAEDAAT, SRMEAEDAATYYC,  
15 ATYYCHQRSTYPL, TYYCHQRSTYPLT, SYTPLTFGSGTKL, TYPLTFGSGTKLE,  
YPLTFGSGTKLEL

Las secuencias peptídicas de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Tac *humanizado* con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

20 actividad de unión a MHC de clase II humano son:

VQLVQSGAEVKKP, QLVQSGAEVKKPG, AEVKKPGSSVKVS, SSVKVSCKASGYT,  
VKVSCKASGYTFT, KVSCKASGYTFTS, ASGYTFTSYRMHW, SGYTFTSYRMHWV,  
25 YTFTSYRMHWVRQ, TSYRMHWVRQAPG, YRMHWVRQAPGQG, MHVIRQAPGQGLE,  
HWVRQAPGQGLEW, RQAPGQGLEWIGY, APGQGLEWIGYIN, QGLEWIGYINPST,  
LEWIGYINPSTGY, EWIGYINPSTGYT, WIGYINPSTGYTE, IGYINPSTGYTEY,  
GYINPSTGYTEYN, TGYTEYNQKFKDK, TEYNQKFKDKATI, QKFKDKATITADE,  
30 ATITADESTNTAY, TITADESTNTAYM, TNTAYMELSSLRS, TAYMELSSLRSED,  
AYMELSSLRSED, MELSSLRSED, TAV, SSLRSED, TAVYYC, SLRSED, TAVYYCA,  
RSED, TAVYYCARG, TAVYYCARGGGVF, AVYYCARGGGVFD, VYYCARGGGVFDY,  
35 GGVFDYWGQGLTLV, GVFDYWGQGLTLVT, FDYWGQGLTLVTVS, DYWGQGLTLVTVSS

Las secuencias peptídicas de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Tac *humanizado* con posible actividad de unión a MHC de clase II humano son:

40 IQMTQSPSTLSAS, STLSASVGDRVIT, ASVGDRVITITCSA, DRVITITCSASSSI,  
VTITCSASSSISY, TITCSASSSISYM, SSISYMHWYQQKP, ISYMHWYQQKPGK,  
SYMHWYQQKPGKA, MHWYQQKPGKAPK, HWYQQKPGKAPKL, QKPGKAPKLLIYT,  
45 PKLLIYTTSNLAS, KLLIYTTSNLASG, LLIYTTSNLASGV, LIYTTSNLASGVP,  
TTSNLASGVPARF, SNLASGVPARFSG, SGVPARFSGSGSG, ARFSGSGSGTEFT,  
SGSGTEFTLTISS, GTEFTLTISSLQP, TEFTLTISSLQPD, FTLTISLQPDDEF,  
LTISLQPDDEFAT, TISLQPDDEFATY, SSLQPDDEFATYYC, SLQPDDEFATYYCH,  
50 DDEFATYYCHQRST, ATYYCHQRSTYPL, TYYCHQRSTYPLT, STYPLTFGQGTKV,  
TYPLTFGOGTKVE, YPLTFGOGTKVEV

### Ejemplo 21

*Anticuerpo 14.18*

Siempre que no se indique lo contrario, todos los aminoácidos de las cadenas variables pesada y ligera se enumeran según Kabat y col. 1991 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services). Los posibles epítopes de células T se numeran con el número de línea del primer aminoácido de un epítopo, contando desde el primer aminoácido de las cadenas pesada y ligera.

### 1 Comparación con subgrupos de regiones estructurales de ratón

65 Las secuencias de aminoácidos de las cadenas VH y VK del anticuerpo 14.18 murino se compararon con secuencias consenso de los subgrupos de cadenas pesadas y ligeras murinas de Kabat (Kabat y col. 1991). VH de 14.18 puede asignarse al subgrupo II(A) de cadenas pesadas murinas. La secuencia VH de 14.18 se muestra en la SEC N° 1. La comparación con la secuencia consenso de este subgrupo muestra que la histidina de la posición 81 (normalmente

glutamina), la lisina de la posición 82a (normalmente serina o asparagina), la valina de la posición 93 (normalmente alanina) y la serina de la posición 94 (normalmente arginina) son atípicas para este subgrupo. También se encuentran con poca frecuencia los restos de las posiciones 19, 40 y 66 en este subgrupo, pero se considera que tienen efectos menores sobre la capacidad de unión y estructura del anticuerpo. VK de 14.18 puede asignarse al subgrupo II de cadenas kappa murinas. La comparación con la secuencia consenso para este subgrupo muestra que la histidina de la posición 49 es atípica en este subgrupo. Este resto es con más frecuencia tirosina.

## 2 Comparación con regiones estructurales humanas

Las secuencias de aminoácidos de VH y VK del anticuerpo 14.18 murino se compararon con las secuencias de los directorios de línea germinal humana de secuencias VH (Tomlinson y col., *J. Mol. Biol.* 1992: 227, 776-798) y VK (Cox y col. (*Eur. J. Immunol.* 1994; 1-4: 827-36)) y también con las secuencias de la región J de la línea germinal humana (Routledge y col. en "Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man". Clark M ed. Academic Titles, Nottingham pág. 13-44, 1993). La región estructural humana de referencia seleccionada para la VH de 14.18 era DP25 con J<sub>H</sub>6 humana. Esta secuencia de la línea germinal se ha encontrado en un gen de anticuerpo maduro reordenado sin cambios de aminoácidos. En el caso de la región estructural 3, se usó la secuencia del anticuerpo humano maduro 29. Esta secuencia es idéntica a la secuencia murina inmediatamente adyacente al CDR3. La región estructural humana de referencia seleccionada para la VK 14.18 fue DPK22. Esta secuencia de la línea germinal se ha encontrado en un gen de anticuerpo maduro reordenado sin cambios de aminoácidos. En el caso de la región estructural 2, se usó la secuencia del anticuerpo humano maduro 163.5. Esta secuencia es idéntica a la secuencia murina inmediatamente adyacente al CDR2. La secuencia de la región J era la JK2 humana (Routledge y col., 1993).

## 3 Diseño de las secuencias revestidas

Tras la identificación de las secuencias de la región estructural humana de referencia, se cambiaron determinados restos de aminoácidos no idénticos dentro de las regiones estructurales VH y VK de 14.18 por el aminoácido correspondiente en la secuencia humana de referencia. Se excluyen de este proceso los restos que se consideran críticos para la estructura y unión del anticuerpo y no se alteran. Los restos murinos que se mantuvieron en esta etapa eran restos, en su mayor parte, no superficiales y enterrados, alejados, por ejemplo, de los restos del extremo N-terminal que están próximos a las CDR del anticuerpo final. Este proceso da lugar a una secuencia que es, en general, similar a un anticuerpo "revestido" ya que los restos de la superficie son principalmente humanos y los anticuerpos enterrados son como los de la secuencia murina original.

## 4 Análisis de reconocimiento de plegamiento de péptidos

Las secuencias de VH y VK de 14.18 murinas y revestidas se analizaron usando el método según la invención. Las secuencias de aminoácidos se dividen en todos los fragmentos 13mer posibles. Los péptidos 13mer se presentan secuencialmente a los modelos del surco de unión de los alotipos HLA-DR y se asigna una puntuación de unión a cada péptido para cada alelo. Se calcula una puntuación conformacional para cada cadena lateral unida al bolsillo del péptido. Esta puntuación se basa en el solapamiento estérico, posibles puentes de hidrógeno entre péptidos y restos del surco de unión, interacciones electrostáticas y contactos favorables entre los péptidos y los restos del bolsillo. A continuación, la conformación de cada cadena lateral se altera y se recalcula la puntuación. Una vez que se ha determinado la puntuación conformacional más alta, se calcula entonces la puntuación de unión en función de los restos hidrófobos de unión al surco, los restos hidrófilos no pertenecientes al surco y el número de restos que se acomodan dentro del surco de unión. Los epítopes conocidos que se unen al para NMC de clase II alcanzan una puntuación de unión significativa prácticamente sin falsos negativos. Por tanto, los péptidos que alcanzan una puntuación de unión significativa con el análisis actual se consideran posibles epítopes de células T. En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis de reconocimiento de plegamiento de péptidos para las secuencias murinas y revestidas.

TABLA 1

*Posibles epítopes de células T en secuencias murinas y revestidas del anticuerpo 14.18*

| Secuencia              | Número de posibles epítopes de células T | Localización de los posibles epítopes                                              |
|------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| VH murina de 14,18     | 11                                       | 3(17), 9(15), 30(5), 35(17), 39(15), 43(9), 58(12), 62(11), 81(11), 84(16), 101(7) |
| VH revestida de 14. 18 | 5                                        | 43(9), 58(12), 62(11), 81(11), 84(16)                                              |
| VK murina de 14.18     | 7                                        | 7(7), 13(11), 27(15), 49(11), 86(17), 97(11), 100(4)                               |
| VK revestida de 14. 18 | 5                                        | 27(15), 49(11), 86(17), 97(11), 100(17)                                            |

### 5 Eliminación de posibles epítopes de células T

Los posibles epítopes de células T se eliminan realizando sustituciones de aminoácidos en el péptido en particular que constituye el epítopo. Las sustituciones se realizaron insertando aminoácidos de propiedades fisicoquímicas similares, si es posible. Sin embargo, para eliminar algunos posibles epítopes, puede ser necesario sustituir aminoácidos de diferente tamaño, carga o hidrofobicidad. Si tienen que hacerse cambios en las regiones CDR que puedan tener un efecto sobre la unión, es necesario obtener una variante con y sin la sustitución del aminoácido en particular. El número lineal de los restos aminoácidos para sustitución se da con el número de Kabat entre corchetes. Los posibles epítopes de células T se denominan según el número lineal del primer resto del segmento 13mer.

Los cambios de aminoácidos necesarios para eliminar epítopes de células T de la región variable de la cadena pesada de 14.18 *revestida* eran los siguientes:

- 1 La sustitución de isoleucina por prolina en la posición 41 (número 41 de Kabat), combinada con la sustitución de leucina por alanina en la posición 50 de la CDR2 elimina el posible epítopo de la posición 43.
- 2 Una alternativa a (1), la sustitución de treonina por leucina en la posición 45 (número 45 de Kabat) con prolina en la posición 41 (número 41 de Kabat) también elimina el posible epítopo de la posición 43.
- 3 La sustitución de serina por glicina en la posición 66 (número 65 de Kabat) en la CDR2 y valina por alanina en la posición 68 (número 67 de Kabat) elimina el posible epítopo en la posición 58. La serina se encuentra en esta posición en las secuencias de los anticuerpos humanos y de ratón.
- 4 La sustitución de isoleucina por leucina en el resto 70 (Kabat: 69) reduce de 11 a 4 el número de alotipos MHC que se une al posible epítopo en la posición 62.
- 5 La sustitución de alanina por valina en la posición 72 (número 71 de Kabat) elimina el posible epítopo de la posición 62. El tamaño del aminoácido en esta posición es crítico y la alanina tiene un tamaño e hidrofobicidad similares a los de la valina.
- 6 La sustitución de treonina por serina en la posición 91 (número 87 de Kabat) elimina los posibles epítopes de las posiciones 81 y 84.

Las sustituciones de aminoácidos necesarias para eliminar los posibles epítopes de células T de la región variable de la cadena ligera de 14.18 *revestida* eran las siguientes:

1. La sustitución de serina por arginina en la posición 32 (número 27e de Kabat) elimina el posible epítopo de la posición 27. Este resto está dentro de CDR2, sin embargo, la serina se encuentra a menudo en la posición tWs de los anticuerpos de ratón y humanos. No se conocen cambios fuera de la región CDR que pueda eliminar este posible epítopo de células T.
2. La sustitución de tirosina por histidina en la posición 54 (número 49 de Kabat) elimina el posible epítopo en la posición 43. La tirosina es el aminoácido que se encuentra con más frecuencia en la posición 49 de los anticuerpos de ratón y humano.
3. Un cambio alternativo a (2) para eliminar el posible epítopo de la posición 43, es la sustitución de metionina por leucina en la posición 51 (número 46 de Kabat). La metionina tiene un tamaño e hidrofobicidad similares a la leucina.
4. La sustitución de metionina por leucina en la posición 88 (número 83 de Kabat) elimina el posible epítopo de la posición 86.
5. La sustitución de treonina por leucina en la posición 102 (número 96 de Kabat) en CDRH3, cuando se combina con glutamina por glicina en la posición 105 (número 100 de Kabat) reduce de 11 a 5 el número de alotipos de MHC que se unen al posible epítopo de la posición 97.
6. Un cambio alternativo a (5) para eliminar el posible epítopo de la posición 97, es la sustitución de prolina por leucina en la posición 102 (número 96 de Kabat).
7. La sustitución de valina por leucina en la posición 110 (número 104 de Kabat) elimina el posible epítopo de la posición 100.

### 6 Diseño de secuencias desinmunizadas

Las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras desinmunizadas se diseñaron en relación con los cambios necesarios para eliminar posibles epítopes de células T y considerando los restos de la región estructural que podrían ser

críticos para la estructura y unión del anticuerpo. Además de las secuencias desinmunizadas basadas en la secuencia revestida, se diseñó una secuencia adicional para cada VH y VK basada en la secuencia murina denominada versión del péptido murino obtenido por reconocimiento de plegamiento (MoPT, Mouse peptide threaded). Para esta versión, se realizaron cambios directamente en la secuencia murina para eliminar los epítopes de células T, pero sólo se realizan los cambios fuera de las CDR que no se consideren perjudiciales para la unión. En esta versión de la secuencia desinmunizadas no se han realizado intentos para eliminar los epítopes de la superficie (células B).

La VH primaria desinmunizada incluye las sustituciones 1, 3, 4, 5 y 6 de la Sección 5 anterior y no incluye posibles epítopes de células T. Se diseñaron cuatro VH desinmunizadas adicionales para probar el efecto de las diversas sustituciones necesarias para la unión del anticuerpo. La versión 2 es una alternativa a la versión 1 en la que se ha usado una sustitución alternativa (2 de la Sección 2.5 anterior) para eliminar el mismo posible epítopo de células T. En la Tabla 2 se detallan las alteraciones acumuladas realizadas en la secuencia primaria desinmunizada (14.18DIVH1) y los posibles epítopes de células T restantes. Se incluye como comparación la versión de reconocimiento de plegamiento de ratón.

TABLA 2

*Cambios de aminoácidos y posibles epítopes en la VH desinmunizada de 14.18*

| Variante    | Cambios de restos acumulados | Posibles epítopes (nº de posibles epítopes que unen MHC de los 18 probados) |
|-------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 14.18DIVH1  | ninguno                      | ninguno                                                                     |
| 14.18DIVH2  | 41I → P, 45L → T, 50L → A    | ninguno                                                                     |
| 14.18DIVH3  | 65S → G                      | 58(8)                                                                       |
| 14.18DIVH4  | 71A → V                      | 58(8), 62(4)                                                                |
| 14.18DIVH5  | 45T → L, 41P → I             | 43(9), 58(8), 62(4)                                                         |
| 14.18MoPTVH | NA                           | 43(9), 58(12), 62(11)                                                       |

La VK primaria desinmunizada incluye las sustituciones 1, 2, 4, 6 y 7 en la Sección 5 anterior. La VK primaria desinmunizada no incluye posibles epítopes de células T. Se diseñaron cinco VK desinmunizadas adicionales para probar el efecto de las diversas sustituciones necesarias para la unión del anticuerpo. La versión 2 es una alternativa de la versión 1 en la que se ha utilizado una sustitución diferente para eliminar el posible epítopo de células T en las posición 43. La versión 3 incluye la sustitución alternativa (6 en la Sección 2.5 anterior), que reduce de 11 a 5 el número de alotipos que se unen al posible epítopo de la posición 97. En la Tabla 3 se detallan las alteraciones acumuladas realizadas en la secuencia primaria desinmunizada (14.18DIVK1) y los posibles epítopes de células que se mantienen.

TABLA 3

*Cambios de aminoácidos y posibles epítopes en la VK desinmunizada de 14.18*

| Variante    | Cambios de restos acumulados* | Posibles epítopes (nº de posibles epítopes que unen MHC de los 18 probados) |
|-------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 14.18DIVK1  | Ninguno                       | ninguno                                                                     |
| 14.18DIVK2  | 46L → M, 49Y → H              | ninguno                                                                     |
| 14.18DIVK3  | 96P → T, 100Q → G             | 97(5)                                                                       |
| 14.18DIVK4  | 96T → L                       | 97(11)                                                                      |
| 14.18DIVK5  | 27e S → R                     | 27(15), 97(11)                                                              |
| 14.18DIVK6  | 46M → L                       | 27(15), 49 (11), 97(11)                                                     |
| 14.18MoPTVK | NA                            | 27(15), 49 (11), 97(11), 100(4)                                             |

## ES 2 309 167 T3

*Secuencias de versiones de epítopes modificados:*

VH de 14.18 revestida:

EVQLQLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQAPGQRLEWIGRIDPYYGGTSYNQKFKGRAT  
LSVDKSSSQAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTITVTVSS

VK de 14.18 revestida:

DVVMQTSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFGVDPDRFSG  
SGSGTDFTLTISRLEAEDLAVYFCSQSTHVPPLTFGQGTKLEIK

VH1 de 14.18 desinmunizada

EVQLQLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQAIGQRLEWIGRIDPYYGGTSYNQKFKSRVT  
ITADKSSSQAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQGTITVTVSS

VK1 de 14.18 desinmunizada

DVVMQTSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSG  
SGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPTTFGQGTKVEIK

VH2 de 14.18 desinmunizada

EVQLQLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQAPGQRTEWIGRIDPYYGGTSYNQKFKSRVT  
ITADKSSSQAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQGTITVTVSS

VK2 de 14.18 desinmunizada

DVVMQTSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKMLIHKVSNRFGVDPDRFSG  
SGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPTTFGQGTKVEIK

VH3 de 14.18 desinmunizada

EVQLQLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQAPGQRTEWIGRIDPYYGGTSYNQKFKGRVT  
ITADKSSSQAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQGTITVTVSS

VK3 de 14.18 desinmunizada

DVVMQTSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKMLIHKVSNRFGVDPDRFSG  
SGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPTTFGGGTKVEIK

VH4 de 14.18 desinmunizada

EVQLQLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQAPGQRTEWIGRIDPYYGGTSYNQKFKGRVT  
ITVDKSSSQAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQGTITVTVSS

VK4 de 14.18 desinmunizada

DVVMQTSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKMLIHKVSNRFGVDPDRFSG  
SGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPLTFGGGTKVEIK

VH5 de 14.18 desinmunizada

EVQLQLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQAIGQRLEWIGRIDPYYGGTSYNQKFKGRVT  
ITVDKSSSQAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQGTITVTVSS

VK5 de 14.18 desinmunizada

DVVMQTSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKMLIHKVSNRFGVDPDRFSG  
SGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPLTFGGGTKVEIK

VH de 14.18 de ratón, péptido de reconocimiento de plegamiento (MoPT)

EVQLVQSGPEVEKPSASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQAIGKSLEWIGRIDPYYGGTSYNQKFKGRAT  
LTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQGTITVTVSS

VK de 14.18 de ratón, péptido de reconocimiento de plegamiento (MoPT)

DVVMQTPTGSLPVSAAGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKMLIHKVSNRFGVDPDRFSG

SGSGTDFTLKISRVEAEDSGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELK

VH de 14.18 de ratón

EVQLQLQSGPELEKPSASVMISCKASGSSFTGYNMNWRQNIQKSLEWIGAIDPYYGGTSYNQKFKGRAT

LTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSTVTVSS

VK de 14.18 de ratón

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLOKPGQSPKLLIHKVSNRFGVDPDRFSG

SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELK

## Ejemplo 22

### Anticuerpo KS

#### 1 Comparación con regiones estructurales de subgrupos de ratón

Las secuencias de aminoácidos de VH y VK del anticuerpo KS murino se compararon con secuencias consenso de los subgrupos de cadenas pesadas y ligeras murinas de Kabat (Kabat y col. 1991). La cadena VH del anticuerpo KS murino no pudo asignarse a ningún subgrupo, pero está más próxima a los subgrupos II(A) y V(A). Se encontraron restos poco comunes en la posición 2 que normalmente es valina, 46 que normalmente es ácido glutámico y 68 que normalmente es treonina. Más frecuentemente, el resto 69 es leucina o isoleucina. En la posición 82b, lo más frecuente es que se encuentre serina. La cadena VK de KS murino puede asignarse al *subgrupo* VI (Figura 2). Se encontraron restos poco comunes en las posiciones 46 y 47 que normalmente son ambas leucina. El resto 58 es poco común ya que normalmente se encuentra leucina o valina en esta posición.

#### 2 Comparación con regiones estructurales humanas

Las secuencias de aminoácidos de VH y VK del anticuerpo KS murino se compararon con las secuencias de los directorios de línea germinal humana de secuencias VH (Tomlinson y col. 1992) y VK (COX y col. 1994) y también con las secuencias de la región J de la línea germinal humana (Routledge y col. 1993). La región estructural humana de referencia seleccionada para la  $V_H$  de KS era DP10 con JH6 humana. Esta secuencia de la línea germinal se ha encontrado en un gen de anticuerpo maduro reordenado sin cambios de aminoácidos. La región estructural humana de referencia seleccionada para VK de KS era B1. En el caso de la región estructural 2, se usó la secuencia del anticuerpo humano maduro IMEV (en Kabat y col. 1991). Esta secuencia es idéntica a la secuencia murina inmediatamente adyacente a la CDR2. La secuencia de la región J era JK4 humana. Esta secuencia de línea germinal no se ha encontrado como cadena ligera del anticuerpo reordenado maduro.

#### 3 Diseño de las secuencias revestidas

Tras la identificación de las secuencias de la región estructural de referencia, se cambiaron determinados restos de aminoácidos no idénticos dentro de las regiones estructurales VH y VK de 425 por el aminoácido correspondiente en la secuencia humana de referencia. Se excluyeron de este proceso los restos que se consideraron críticos para la estructura y unión del anticuerpo y no se alteraron. Los restos murinos que se mantuvieron en esta etapa eran restos, en su mayor parte, no superficiales y enterrados, alejados por ejemplo de los restos del extremo N-terminal que están próximos a las CDR del anticuerpo final. Este proceso produce una secuencia que es, en general, similar a un anticuerpo “revestido” ya que los restos de la superficie son en su mayoría humanos y los restos enterrados son como los de la secuencia murina original.

#### 4 Análisis de reconocimiento de plegamiento de péptidos

Las secuencias de VH y VK murinas y revestidas de KS se analizaron usando el método según la invención. Las secuencias de aminoácidos se dividen en todos los fragmentos 13mer posibles. Los péptidos 13mer se presentan secuencialmente a los modelos del surco de unión de los alotipos HLA-DR y se asigna una puntuación de unión a cada péptido para cada alelo. Se calcula una puntuación conformacional para cada cadena lateral unida al bolsillo del péptido. Esta puntuación se basa en el solapamiento estérico, posibles puentes de hidrógeno entre péptidos y restos del surco de unión, interacciones electrostáticas y contactos favorables entre los péptidos y los restos del bolsillo. A continuación, se altera la conformación de cada cadena lateral y se recalcula la puntuación. Una vez que se ha determinado la puntuación conformacional más alta, se calcula entonces la puntuación de unión en función de los restos hidrófobos de unión de surco, los restos hidrófilos no pertenecientes al surco y el número de restos que se acomodan dentro del surco de unión. Los epítopes conocidos que se unen al NMC de clase II alcanzan una puntuación de unión significativa prácticamente sin falsos negativos. Por tanto, los péptidos que alcanzan una puntuación de unión significativa con el análisis actual se consideran posibles epítopes de células T. En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis de reconocimiento de plegamiento de péptidos para las secuencias murinas y revestidas.

TABLA 1

*Posibles epítopes de células T en secuencias de KS murinas y revestidas*

| Secuencia          | Número de posibles epítopes de células T | Localización de posible epítopes (nº de posibles epítopes que unen MHC) |
|--------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| VH murina de KS    | 6                                        | 35(11), 62(17), 78(12), 81(12), 89(6), 98(15)                           |
| VH murina de KS    | 5                                        | 30(7), 62(15), 78(11), 89(6), 98(15)                                    |
| VK murina de KS    | 6                                        | 1(14), 2(5), 17(5), 27(5), 51(13), 72(18)                               |
| VK revestida de KS | 3                                        | 1(17), 27(5), 51(13)                                                    |

*5 Eliminación de posibles epítopes de células T*

Los posibles epítopes de células T se eliminan realizando sustituciones de aminoácidos en el péptido en particular que constituye el epítipo. Las sustituciones se realizaron insertando aminoácidos de propiedad fisicoquímicas similares, si es posible. Sin embargo, para eliminar algunos posibles epítopes, puede ser necesario sustituir aminoácidos de tamaño, carga o hidrofobicidad diferentes. Si tienen que hacerse cambios en las CDR que pudieran afectar a la unión, entonces es necesario obtener una variante con y sin la sustitución del aminoácido en particular. La numeración de los restos aminoacídicos para la sustitución se realiza según Kabat. Los posibles epítopes de células T se denominan según el número lineal del primer resto del segmento 13mer.

Los cambios de aminoácidos necesarios para eliminar epítopes de células T de la región variable de la cadena pesada de KS revestida eran los siguientes:

1. La sustitución de arginina por lisina en la posición 38 (número 38 de Kabat) elimina el posible epítipo de la posición 30.
2. La sustitución de alanina por leucina en el resto 72 (número 71 de Kabat) e isoleucina por fenilalanina en la posición 70 (número 69 de Kabat) elimina el posible epítipo en el resto 62. Se encuentran una isoleucina en la posición número 69 de Kabat y alanina en la posición número 71 de Kabat en una secuencia VH de la línea germinal humana, DP10.
3. La sustitución de leucina por lisina en la posición 79 (número 78 de Kabat) elimina el posible epítipo de la posición 78.
4. La sustitución de treonina por metionina en la posición 91 (número 87 de Kabat) elimina el posible epítipo de la posición número 89.
5. La sustitución de metionina por isoleucina en la posición 100 (número 96 de Kabat) en CDRH3 elimina el posible epítipo del resto 98. No se conoce cambios fuera de CDRH3 que elimine este posible epítipo.

Las sustituciones de aminoácidos necesarias para eliminar los posibles epítopes de células T de la región variable de la cadena ligera de KS revestida eran las siguientes:

1. La sustitución de isoleucina por metionina en el resto 32 (número 33 de Kabat) elimina el posible epítipo del resto número 27. Este resto está dentro de CDR2. En los anticuerpos humanos normalmente se encuentra isoleucina en esta posición.
2. El posible epítipo de la posición 1 se elimina sustituyendo la valina por leucina en este residuo (número 3 de Kabat).
3. La sustitución de serina por alanina en el resto 59 (número 60 de Kabat) elimina el posible epítipo de la posición 51.

*6 Diseño de secuencias desinmunizadas*

Las secuencias de las cadenas pesada y ligera desinmunizadas se diseñaron en relación con los cambios necesarios para eliminar posibles epítopes de células T y considerando los restos de la región estructural que podrían ser críticos para la estructura y unión del anticuerpo. Además de las secuencias desinmunizadas basadas en la secuencia revestida, se diseñó una secuencia adicional para cada VH y VK basada en la secuencia murina denominada la versión del péptido murino obtenido por reconocimiento de plegamiento (MoPT). En el caso de esta versión, se realizaron cambios directamente en la secuencia murina para eliminar los epítopes de células T, pero sólo se realizan los cambios fuera de las CDR que no se consideren perjudiciales para la unión. En esta versión de la secuencia desinmunizadas no se han realizado intentos para eliminar los epítopes de superficie (células B). La VH primaria desinmunizada incluye

las sustituciones 1 a 5 en la Sección 5 anterior y un cambio extra en el resto 43 (número 43 de Kabat). La lisina que se encuentra en la secuencia murina se sustituyó por la glutamina de la región estructural humana. La lisina está cargada positivamente y, por tanto es significativamente diferente a la glutamina; esta región puede estar implicada en los contactos VH/VL. La VH primaria desinmunizada no incluye posibles epítopes de células T. Se diseñaron 4 VH desinmunizadas adicionales para probar el efecto de las diversas sustituciones necesarias para la unión del anticuerpo. En la Tabla 2 se detallan las alteraciones acumuladas realizadas en la secuencia primaria desinmunizada (KSDIVHv1) y los posibles epítopes de células que permanecen.

TABLA 2

*Cambios de aminoácidos y posibles epítopes en la VH desinmunizada de KS*

| Variante    | Cambios de restos acumulados | Posibles epítopes (nº de posibles epítopes que unen MHC de los 18 probados) |
|-------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| KSDIVHv1    | Ninguno                      | ninguno                                                                     |
| KSDIVHv8982 | 96M → I                      | 98(15)                                                                      |
| KSDIVHv3    | 71A → L, 78L → A             | 62(16), 78(11), 98(15)                                                      |
| KSDIVHv4    | 38R → K                      | 30(7), 62(16), 78(11), 98(15)                                               |
| KSDIVHv5    | 68T → A, 69I → F             | 30(7), 62(17), 78(11), 98(15)                                               |
| KSMoPTVH    | NA                           | 98(15), 78(12)                                                              |

La VK primaria desinmunizada incluye las sustituciones 1 a 3 de la Sección 5 anterior. Se diseñaron tres VK desinmunizadas adicionales para probar el efecto de las diversas sustituciones necesarias para la unión del anticuerpo. En la Tabla 3 se detallan las alteraciones acumuladas realizada en la secuencia primaria desinmunizada (KSDIVKv1) y los posibles epítopes de células que permanecen.

TABLA 3

*Cambios de aminoácidos y posibles epítopes en la VK desinmunizada de KS*

| Variante | Cambios de restos acumulados | Posibles epítopes (nº de posibles epítopes que unen MHC de los 18 probados) |
|----------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| KSDIVKv1 | Ninguno                      | ninguno                                                                     |
| KSDIVKv2 | 33I → M                      | 27(5)                                                                       |
| KSDIVKv3 | 3V → L                       | 1(17), 27(5)                                                                |
| KSDIVKv4 | 60S → A                      | 1(17), 27(5), 5(13)                                                         |
| KSMoPTVK | NA                           | ninguno                                                                     |

*Secuencias de versiones de epítopes modificados:*

VH de KS revestida:

QIQLVQSGPELKKPGSSVKiSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFT  
fTLETSTSTAYLQLNNLRsEDmATYfcVRFISKGDYWGQGTtTVTVSS

VK de KS revestida:

QILLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQKPGQPPKWPWFDTSNLASGFARFSGSGSGTS  
YTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPYTFGGGTKVEIK

VH1 de KS desinmunizada

QIQLVQSGPELKKPGSSVKiSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFT  
ITAETSTSTLYLQLNNLRSEDmATYFCVRFMSKGDYWGQGTtTVTVSS

VK1 de KS desinmunizada

# ES 2 309 167 T3

QIVLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYILWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLAGFPSRFSGSGSGTS  
YTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGTKVEIK

5 VH2 de KS desinmunizada  
QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFT  
ITAETSTSTLYLQLNNLRSEDATYFCVRFISKGDYWGQGT'TTVTVSS

10 VK2 de KS desinmunizada  
QIVLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLAGFPSRFSGSGSGTS  
YTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGTKVEIK

15 VH3 de KS desinmunizada  
QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFT  
ITLETSTSTAYLQLNNLRSEDATYFCVRFISKGDYWGQGT'TTVTVSS

20 VK3 de KS desinmunizada  
QILLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLAGFPSRFSGSGSGTS  
YTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGTKVEIK

25 VH4 de KS desinmunizada  
QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFT  
ITLETSTSTAYLQLNNLRSEDATYFCVRFISKGDYWGQGT'TTVTVSS

30 VK4 de KS desinmunizada  
QILLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLAGFPPARFSGSGSGTS  
YTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGTKVEIK

35 VH5 de KS desinmunizada  
QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFA  
FTLETSTSTAYLQLNNLRSEDATYFCVRFISKGDYWGQGT'TTVTVSS

40 VK5 de KS desinmunizada  
QILLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGSSPKPWIDTSNLAGFPPARFSGSGSGTSYT  
LTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGTKVEIK

45 VH de KS de ratón, péptido por reconocimiento de plegamiento (MoPT)  
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFV  
FSLETSASTAFLQLNNLRSEDATYFCVRFISKGDYWGQGT'SVTVSS

50 VK de KS de ratón, péptido por reconocimiento de plegamiento (MoPT)  
QIVLTQSPATLSASPGERVITITCSASSSVSYMLWYLQKPGSSPKPWIFDTSNLAGFPSRFSGSGSGTT  
YSLIISLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGTKLEIK

55 VH de KS de ratón  
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWRQTPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFA  
FSLETSASTAFLQINNLRNEDMATYFCVRFISKGDYWGQGT'SVTVSS

60 VK de KS de ratón  
QILLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMLWYQQKPGSSPKPWIFDTSNLAGFPPARFSGSGSGTS  
YSLIISMEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGTKLEIK

65

## REIVINDICACIONES

1. Un método adecuado para identificar uno o más péptidos posibles epítopes de células T dentro de la secuencia de aminoácidos de una molécula biológica por etapas que incluyen la determinación de la unión de estos péptidos a moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos, comprendiendo dicho método las siguiente etapas:

(a) seleccionar una región del péptido que tenga una secuencia de restos de aminoácidos conocida;

(b) probar secuencialmente segmentos de restos de aminoácidos solapantes de tamaño uniforme predeterminado y constituidos por al menos tres restos de aminoácidos de la región seleccionada;

(c) calcular la puntuación de unión de la molécula MHC de clase II para cada uno de dichos segmentos probados mediante la suma de los valores asignados para cada cadena lateral de restos de aminoácidos hidrófobos presente en dicho segmentos de restos de aminoácidos probados y

(d) identificar al menos uno de dichos segmentos adecuados para su modificación, en función de la puntuación de unión calculada a la molécula MHC de clase II de ese segmento, para cambiar la puntuación de unión a MHC de clase II global del péptido sin reducir sustancialmente la utilidad terapéutico del péptido,

**caracterizado** porque la etapa (c) se lleva a cabo usando una función de puntuación de Böhm modificada para incluir el término de repulsión de energía ligando/proteína de van der Vall 12-6 y el término de energía conformacional del ligando

(1) proporcionando una primera base de datos de modelos de moléculas MHC de clase II;

(2) proporcionando una segunda base de datos de cadenas principales peptídicas permitidas para dichos modelos de moléculas MHC de clase II;

(3) seleccionando un modelo a partir de dicha primera base de datos;

(4) seleccionando una cadena principal permitida a partir de dicha segunda base de datos;

(5) identificando cadenas laterales de restos de aminoácidos presentes en cada segmento probado;

(6) determinando el valor de afinidad de unión para todas las cadenas laterales presentes en cada segmento probado;

(7) repetir los pasos (1) a (5) para cada una de dichos modelos y cadenas principales.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el valor asignado a cada cadena lateral aromática es aproximadamente la mitad del valor asignado a cada cadena lateral alifática hidrófoba.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el segmento de restos de aminoácidos probado está compuesto por 13 restos de aminoácidos.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los segmentos de restos de aminoácidos consecutivos probados se solapan en uno a cinco restos de aminoácidos.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que solapan todos excepto un resto de aminoácido de los segmentos de restos de aminoácidos consecutivos probados.

6. Un método para preparar una molécula biológica inmunogénicamente modificada derivada de una molécula parental, en el que la molécula modificada tiene una secuencia de aminoácidos diferente con respecto a dicha molécula parental y muestra una inmunogenicidad reducida con respecto a la molécula parental cuando se expone al sistema inmune de una especie determinada; dicho método comprende:

(i) determinar la secuencia de aminoácidos de la molécula biológica parental o parte de ella;

(ii) identificar uno o más posibles epítopes de células T dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante cualquier método que incluya la determinación de la unión de los péptidos a moléculas de MHC mediante el uso de técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos, (iii) diseñar nuevas variantes de secuencia mediante la alteración de al menos un resto de aminoácido dentro de las secuencias de epítopes de células T originalmente identificadas, modificándose dichas variantes de modo que se reduzca sustancialmente o se elimine la actividad o el número de las secuencias de epítopes de células T y/o el número de alotipos de MHC capaces de unirse a péptidos derivados de dicha molécula biológica como se determina mediante la unión del péptido a las moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos, o mediante la unión de los complejos péptido-MHC a las células T, (iv) construir

## ES 2 309 167 T3

dichas variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y probar dichas variantes para identificar una o más variantes con propiedades deseables y (v), opcionalmente, repetir las etapas (ii) a (iv),

**caracterizado** porque la identificación de las secuencias de epítopes de células T según la etapa (ii) se consigue mediante un método como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. El método de la reivindicación 6, en el que se alteran de 1 a 9 restos de aminoácido de cualquiera de las secuencias de epítopes de células T originalmente presentes.

8. El método según la reivindicación 7, en el que se altera un resto de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de epítopes de células T originalmente presentes.

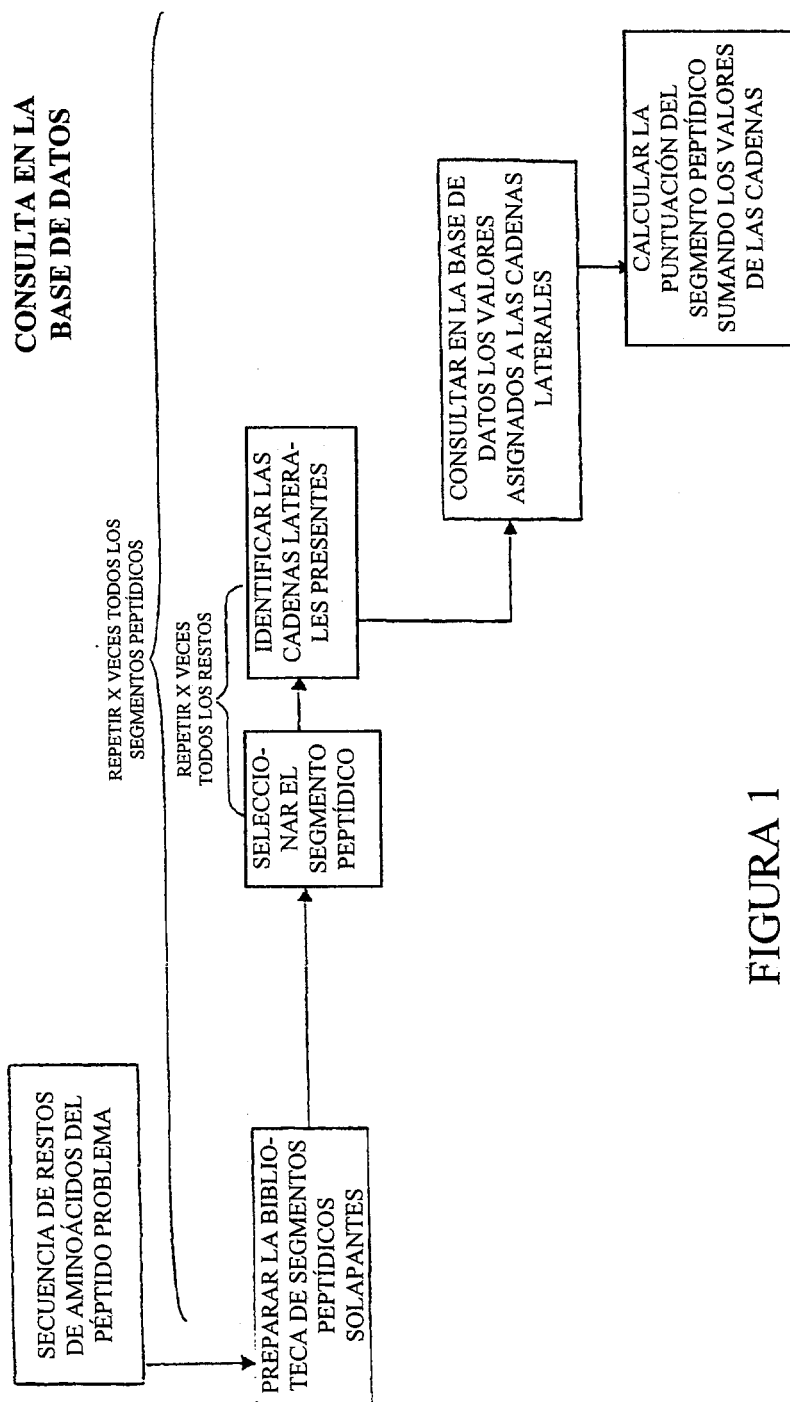
9. El método de la reivindicación 6, en el que la alteración de aminoácidos se realiza con respecto a una secuencia de proteína homóloga.

10. El método de la reivindicación 6, en el que la alteración de aminoácidos se realiza con respecto a técnicas de modelado *in silico*.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la alteración de los restos de aminoácidos supone sustitución, delección o adición de los restos de aminoácidos originalmente presente por otros restos de aminoácidos en posiciones específicas.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que adicionalmente se realiza una alteración más mediante sustitución, adición o delección de aminoácidos específicos para reestablecer la actividad biológica de dicha molécula biológica.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, para preparar un polipéptido, una proteína, una proteína de fusión, un anticuerpo o un fragmento del mismo con inmunogenicidad reducida.



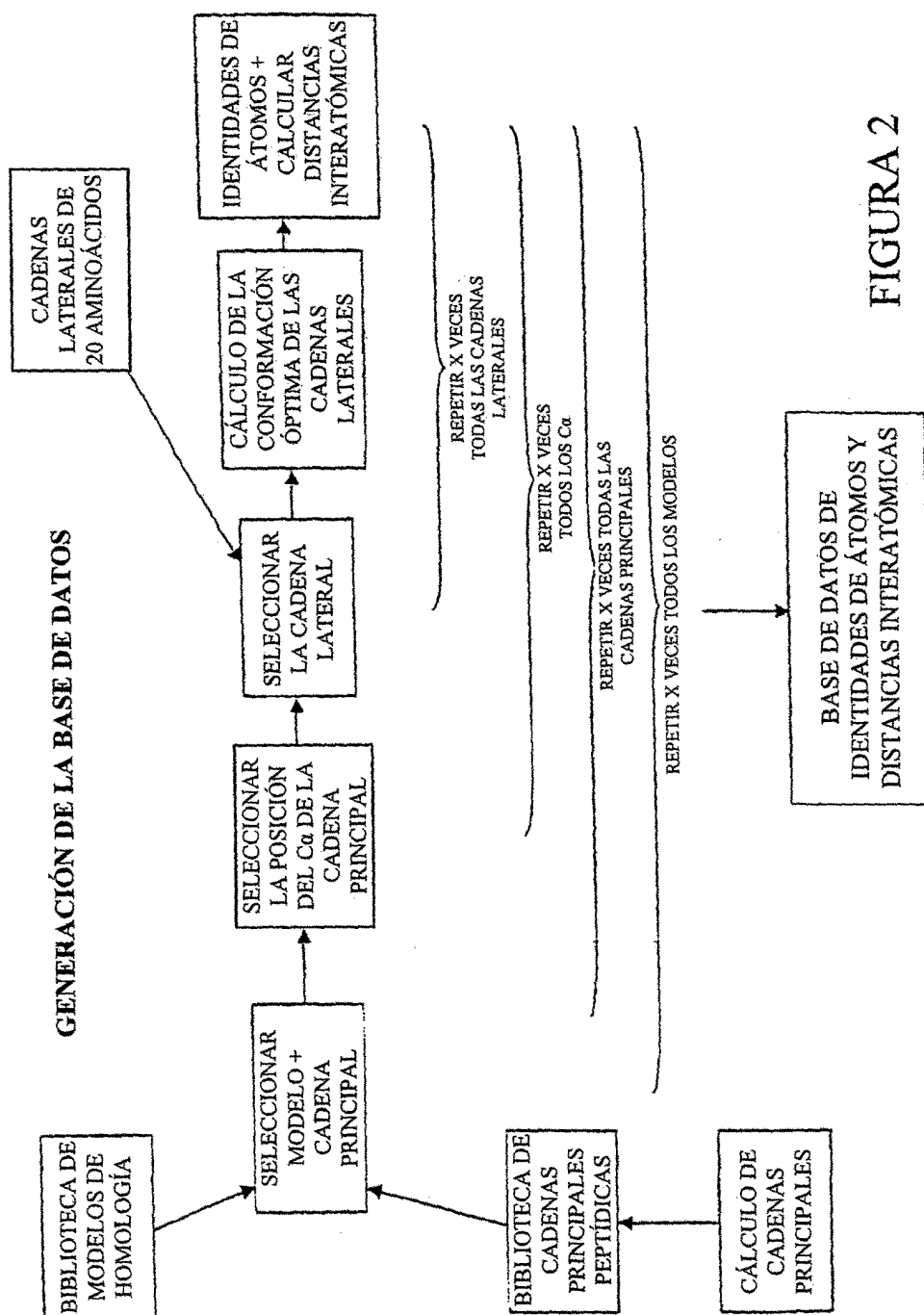


FIGURA 2

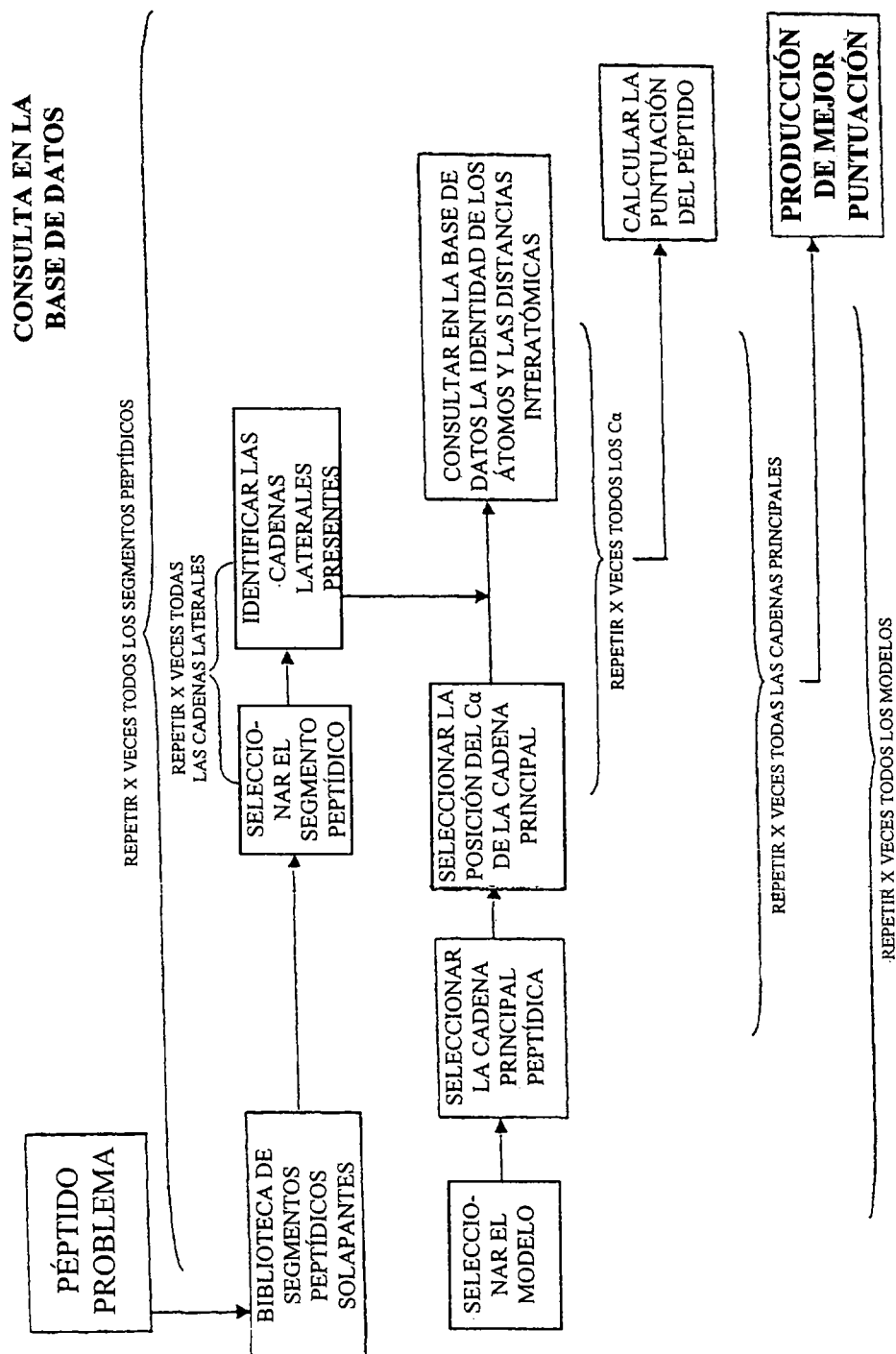


FIGURA 3

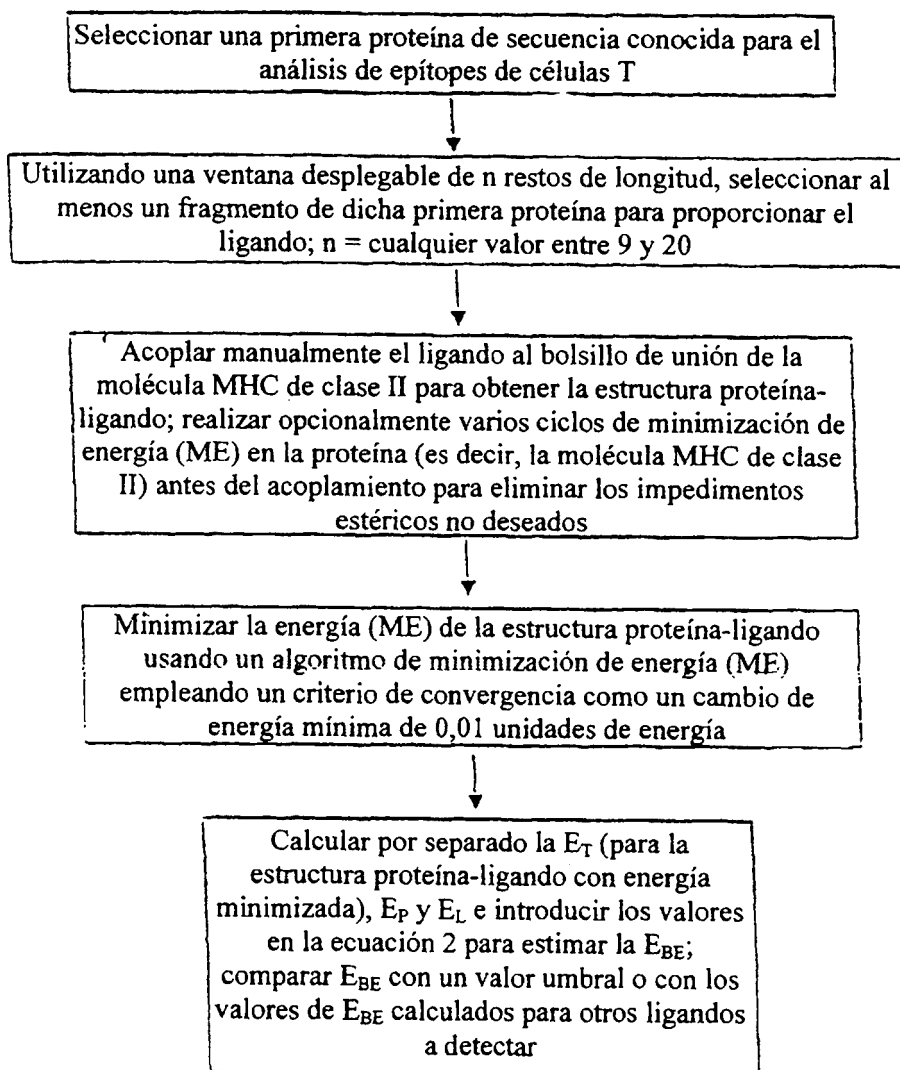


FIGURA 4

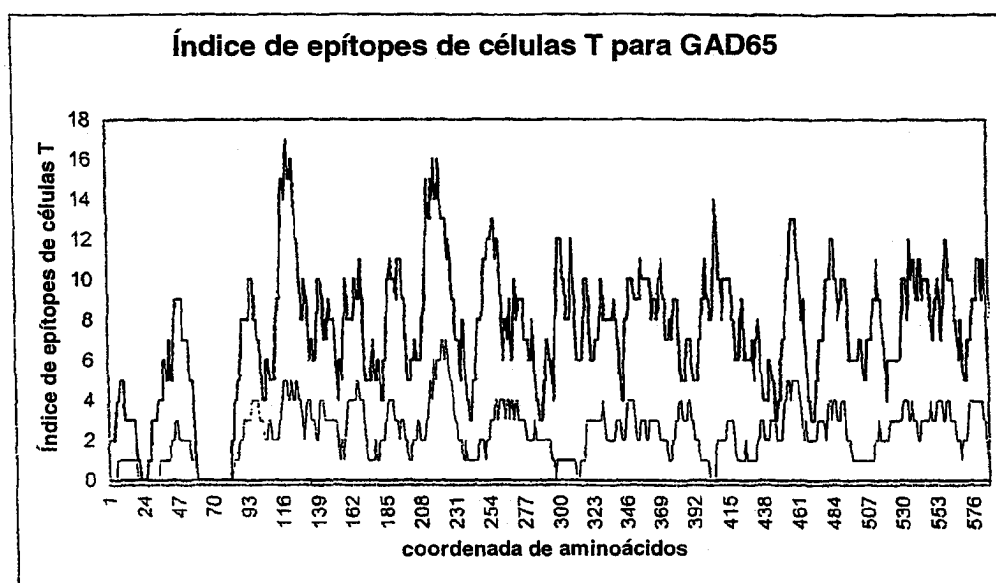


FIGURA 5

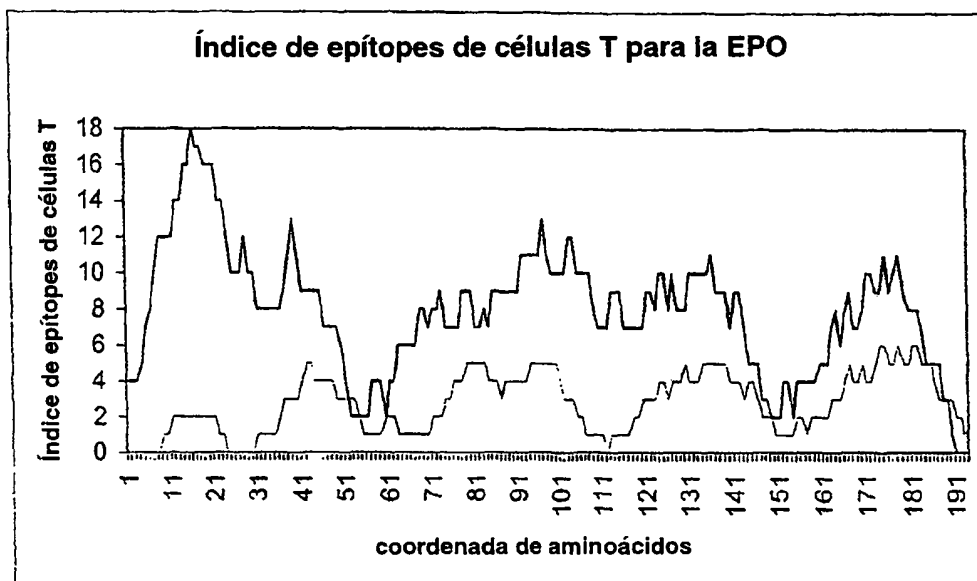


FIGURA 6

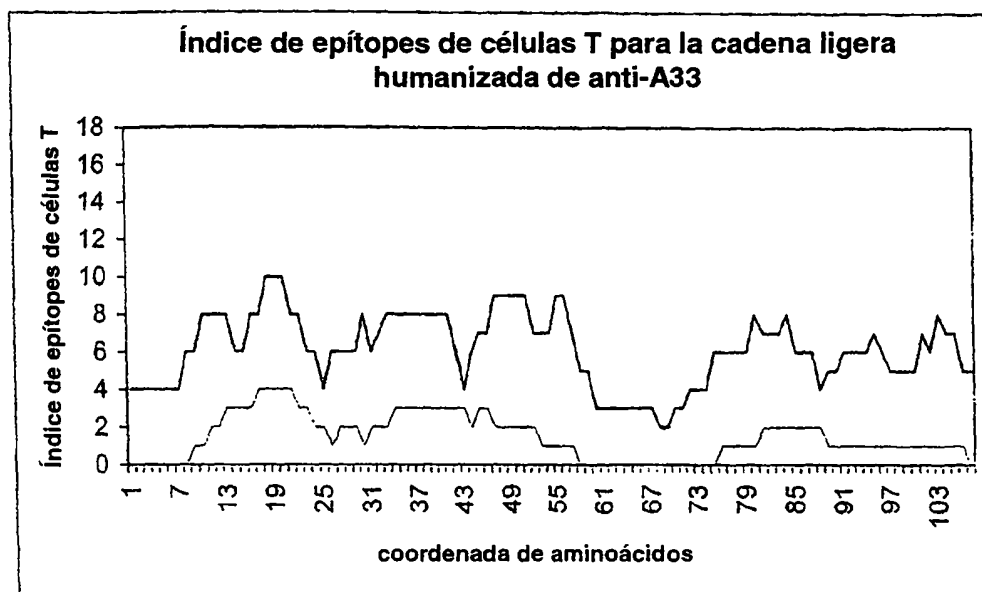


FIGURA 7

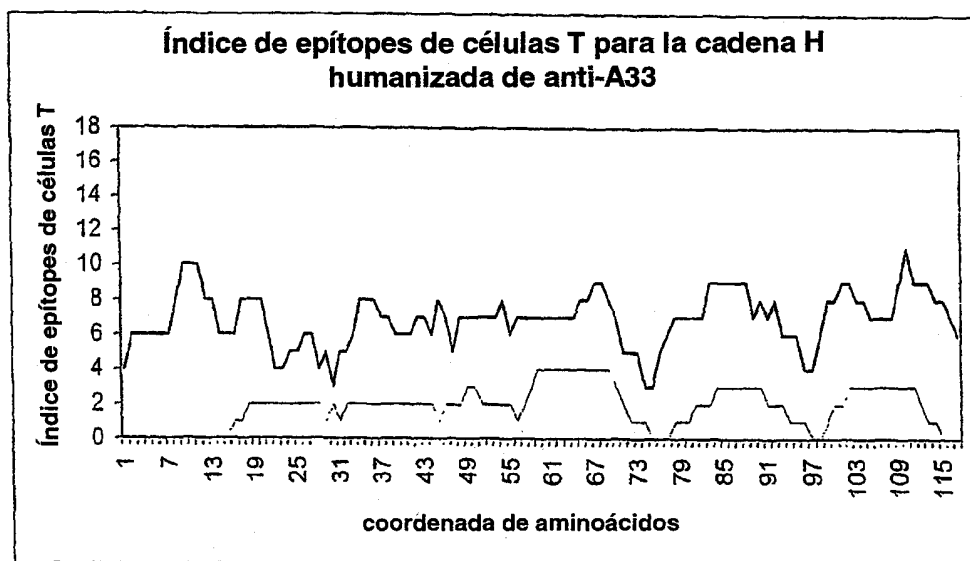


FIGURA 8