



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 662**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01986449 .5**

96 Fecha de presentación : **26.09.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1469721**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2004**

54 Título: **Método de determinación de la inmunogenicidad de proteínas que producen una respuesta inmuno-génica alterada.**

30 Prioridad: **02.10.2000 US 677822**
23.01.2001 US 768080

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2011

73 Titular/es: **Danisco US Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

72 Inventor/es: **Estell, David, A. y**
Harding, Fiona, A.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 361 662 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de determinación de la inmunogenicidad de proteínas que producen una respuesta inmunogénica alterada

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Las proteínas utilizadas en aplicaciones industriales, farmacéuticas y comerciales son de creciente prevalencia. Como resultado, la exposición incrementada debido a esta prevalencia ha sido el responsable de ciertos peligros para la seguridad causados por la sensibilización de ciertas personas a estos péptidos, con lo que la posterior exposición provoca reacciones alérgicas extremas que pueden ser perjudiciales e incluso fatales. Por ejemplo, se sabe que las proteasas provocan una hipersensibilidad peligrosa en algunos individuos. Como resultado, a pesar de la utilidad de proteasas en la industria, por ejemplo, en detergentes de lavandería, cosméticos, tratamiento textil, etc, y la amplia investigación realizada en el campo para proporcionar proteasas mejoradas que presentan, por ejemplo, una eliminación de manchas más eficaz bajo condiciones de detergencia; la utilización de proteasas en la industria ha sido problemática debido a su capacidad para producir una respuesta alérgica hipersensible en algunos humanos.

[0002] Se ha realizado mucho trabajo para aliviar estos problemas. Entre las estrategias exploradas para reducir el potencial inmunogénico del uso de proteasas, se han mejorado procesos de producción que reducen el potencial contacto controlando y minimizando las concentraciones en el punto de trabajo de las partículas de polvo o aerosoles que transportan proteasas en el aire, procesos de granulación mejorados que reducen la cantidad de polvo o aerosol producidos realmente a partir del producto de proteasa, y procesos de recuperación mejorados para reducir el nivel de contaminantes potencialmente alérgicos en el producto final. Sin embargo, los esfuerzos para reducir la alergenidad de proteasa, per se, han sido relativamente insatisfactorios. Alternativamente, se han realizado esfuerzos para enmascarar epítopos en proteasas que son reconocidos por inmunoglobulina E (IgE) en individuos hipersensibles (Publicación PCT No WO 92/10755) o para aumentar o cambiar la naturaleza de los determinantes antigénicos mediante la unión de polímeros o péptidos/proteínas a la proteasa problemática.

[0003] Cuando una respuesta inmune adaptativa aparece en una forma exagerada o inapropiada, se dice que el individuo que experimenta la reacción es hipersensible. Las reacciones de hipersensibilidad son el resultado de respuestas inmunes normalmente beneficiosas que actúan de manera inapropiada y, algunas veces, causan reacciones inflamatorias y daño en los tejidos. Pueden estar provocadas por muchos antígenos; y la causa de la reacción de hipersensibilidad variará de un individuo a otro. La hipersensibilidad no se manifiesta normalmente tras un primer contacto con el antígeno, sino que normalmente aparece tras un contacto posterior. Una forma de hipersensibilidad aparece cuando una respuesta de IgE está dirigida contra antígenos ambientales inocuos, tales como el polen, ácaros del polvo o caspa animal. La liberación resultante de mediadores farmacológicos por mastocitos sensibles a IgE produce una reacción inflamatoria aguda con síntomas, tales como asma o rinitis.

[0004] No obstante, una estrategia que comprende modificar los sitios de IgE no serán en general exitosa en la prevención de la causa de la reacción de sensibilización inicial. Por consiguiente, dichas estrategias, aunque quizás neutralizan o reducen la gravedad de la reacción de hipersensibilidad posterior, no reducirán el número de personas realmente sensibles. Por ejemplo, cuando se sabe que una persona es hipersensible a cierto antígeno, la manera general, y la única segura, de tratar dicha situación es asilar la persona hipersensible del antígeno tanto como sea posible. De hecho, cualquier otro procedimiento de acción sería peligroso para la salud del individuo hipersensible. De este modo, aunque es importante reducir el peligro de una proteína específica para un individuo hipersensible, para fines industriales, sería mucho más valioso hacer que la proteína sea incapaz de iniciar la reacción de hipersensibilidad en primer lugar.

[0005] Los linfocitos T (células T) juegan un papel clave en la inducción y regulación de las respuestas inmunes y en la ejecución de funciones efectoras inmunológicas. Se sabe que la inmunidad específica contra agentes infecciosos y tumores depende de estas células y se cree que contribuyen a la curación de lesiones. Por otro lado, el fallo en el control de estas respuestas puede conducir a la auto-agresión. En general, el antígeno se presenta a las células T en forma de células presentadas de antígeno que, mediante una variedad de mecanismos de la superficie celular, capturan y expresan el antígeno o antígeno parcial de una manera adecuada para el reconocimiento del antígeno por la célula T. Tras el reconocimiento de un epítipo específico por los receptores en la superficies de las células T (receptores de células T), las células T empiezan una serie de interacciones complejas, incluyendo la proliferación, que dan lugar a la producción de anticuerpo por células B. Aunque las células T y las células B son activadas ambas por epítopos antigénicos que existen en una proteína o péptido determinado, los auténticos epítopos reconocidos por estas células mononucleares en general no son idénticos. De hecho, el epítipo que activa una célula T para iniciar la creación de diversidad inmunológica es bastante a menudo no el mismo epítipo que es más tarde

reconocido por células B en el transcurso de la respuesta inmunológica. De este modo, con respecto a la hipersensibilidad, aunque la interacción antigénica específica entre la célula T y el antígeno es un elemento crítico en el inicio de la respuesta inmune a la exposición antigénica, lo específico de esta interacción, es decir el epítipo reconocido, a menudo no es relevante para el posterior desarrollo de una reacción alérgica completa.

5

[0006] La Publicación PCT No. WO 96/40791 da a conocer un proceso para producir conjugados de óxido de polialquileno-polipéptido con una alergenicidad reducida utilizando óxido de polialquileno como material de partida.

10 **[0007]** La Publicación PCT No. WO 97/30148 da a conocer un conjugado de polipéptido con una alergenicidad reducida que comprende una molécula portadora polimérica que tiene dos o más moléculas polipeptídicas acopladas covalentemente a la misma.

15 **[0008]** La Publicación PCT No. WO 96/17929 da a conocer un proceso para producir polipéptidos con una alergenicidad reducida que comprende la etapa de conjugar de 1 a 30 polimoléculas a un polipéptido parental.

20 **[0009]** La Publicación PCT No. WO 92/10755 da a conocer un método de producir variantes de proteínas que provocan una respuesta inmunogénica reducida en animales. En esta solicitud, las proteínas de interés, una serie de proteasas y variantes de las mismas se utilizaron para inmunizar ratas. A continuación, el suero de las ratas se utilizó para medir la reactividad de los anticuerpos policlonales ya producidos y presentes en el suero inmunizado a la proteína de interés y variantes de la misma. A partir de estos resultados, era posible determinar si los anticuerpos en la preparación eran comparativamente más o menos reactivos con la proteína y sus variantes, permitiendo de este modo un análisis de qué cambios en la proteína probablemente neutralizarán o reducirán la capacidad de la Ig de unirse. A partir de estas pruebas en ratas, la conclusión a la que se llegó fue que el cambio de cualquiera de los 309 residuos de subtilisina correspondiente a 127, 128, 129, 130, 131, 151, 138, 151,152,153, 154,161, 25 162,183,167,168, 169,170, 171, 172, 173,174, 175, 176,186, 193, 94,195,196,197, 247, 251, 261 dará lugar a un cambio en el potencial inmunológico.

30 **[0010]** La Publicación PCT No. WO 94/10191 da a conocer proteínas poco alergénicas que comprenden formas oligoméricas de la proteína monomérica parental, donde el oligómero ha mantenido sustancialmente su actividad.

35 **[0011]** WO 00/34317 da a conocer métodos para que las proteínas terapéuticas sean menos inmunogénicas o nada inmunogénicas mediante la extracción de epítopos de células T previamente identificados mediante, por ejemplo la modificación de aminoácidos. También se describen variantes modificadas de las proteínas tratadas de este modo. El análisis de la actividad de proteínas terapéuticas de variante modificada se puede realizar utilizando ratones 40 transgénicos reconstituidos con (partes de) el sistema inmune de la especie elegida para recibir las proteínas terapéuticas.

45 **[0012]** Aunque algunos estudios han proporcionado métodos de reducción de la alergenicidad de ciertas proteínas y la identificación de epítopos que causan reacciones alérgicas en algunos individuos, los ensayos utilizados para identificar estos epítopos implican generalmente la medición de anticuerpo IgE e IgG en suero sanguíneo expuesto previamente al antígeno. Sin embargo, una vez se ha iniciado la reacción de Ig, ya ha tenido lugar la sensibilización. Por consiguiente, existe la necesidad de un método de determinación de epítopos que provocan la sensibilización en primer lugar, ya que la neutralización de estos epítopos dará lugar a una posibilidad significativamente menor de que ocurra la sensibilización, reduciendo de este modo la posibilidad de sensibilización inicial. También existe la 50 necesidad de producir proteínas que producen una respuesta inmunogénica aumentada, y la necesidad de identificar proteínas naturales que producen una respuesta inmunogénica baja. La presente invención cumple con éstas y otras necesidades.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

50

[0013] La presente invención proporciona un método para determinar el potencial alergénico de una proteína modificada, comprendiendo el método las etapas de,

- 55 a) inmunizar un primer ratón transgénico con una proteína de interés e inmunizar un segundo ratón transgénico con una proteína modificada, en el que dicha proteína modificada es una variante dicha proteína de interés y dicha proteína de interés incluye un epítipo de células T, en el que la variante difiere de la proteína de interés por tener un epítipo de células T alterado;
- b) recoger suero de dicho primer y segundo ratón transgénico inmunizado;
- c) medir el suero por las inmunoglobulinas específicas de antígeno; y
- 60 d) comparar la respuesta inmunogénica de dicha variante y dicha proteína de interés; en el que el primer ratón transgénico y el segundo ratón transgénico son HLA DR3/DQ2, y

en el que la variante y la proteína de interés producen una respuesta inmunogénica diferente en dichos ratones transgénicos.

[0014] La inmunoglobulina específica de antígeno puede ser IgG.

5

[0015] En ciertas realizaciones, los ratones transgénicos HLA DR3/DQ2 se han retrocruzado con ratones que carecen de la expresión de moléculas endógenas I-A de clase II.

[0016] La proteína o polipéptido de interés puede ser cualquier proteína o polipéptido de interés. En un aspecto, el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en enzimas, hormonas, factores, vacunas y citoquinas. Tal como se indica en la presente invención, el polipéptido de interés puede ser una enzima. En una realización, la enzima se selecciona del grupo que consiste en lipasa, celulasa, endo-glucosidasa H, proteasa, carbohidrasa, reductasa, oxidasa, isomerasa, transferasa, quinasa y fosfatasa. En realizaciones preferidas, el polipéptido de interés y la variante de dicho polipéptido de interés comprenden cada uno por lo menos parte de la misma actividad. Por ejemplo, si se proporciona una variante de una proteasa, dicha variante producirá una respuesta inmunogénica alterada, pero mantendrá una actividad de proteasa detectable y preferiblemente comparable.

10
15

[0017] El epítipo de células T se puede alterar de diversas maneras que incluyen por sustitución, delección, adición de aminoácidos y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el epítipo de células T se altera mediante sustituciones de aminoácidos. En una realización de la presente invención, las sustituciones de aminoácidos se realizan a los aminoácidos correspondientes de un homólogo del polipéptido de interés, donde el homólogo no comprende el mismo epítipo de células T en la correspondiente posición que el polipéptido de interés. En un aspecto, la parte terminal del polipéptido de interés que comprende por lo menos un epítipo de células T es sustituida por una parte terminal correspondiente del homólogo del polipéptido de interés, donde la sustitución produce dichas diferentes respuestas inmunogénicas.

20
25

[0018] El método de la presente invención se puede utilizar para alterar la inmunogenicidad de un polipéptido de interés mediante la determinación de la inmunogenicidad de dicho polipéptido; la identificación de un epítipo de células T en dicho polipéptido; y la alteración de dicho epítipo de células T para alterar la inmunogenicidad de dicho polipéptido. Tal como se describe en la presente invención, dicha alteración se puede realizar alterando un único aminoácido o cambiando una parte del polipéptido de interés por una parte correspondiente de un homólogo, donde el cambio produce una respuesta inmunogénica alterada.

30

[0019] Otros aspectos de la presente invención serán comprendidos por los expertos en la materia mediante la siguiente descripción.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020]

40 Las Figuras 1 A, B1, B2 y B3 ilustran las secuencias de ADN (SEC ID: NO 1) y aminoácidos (SEC ID: NO 2) para la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN') y un mapa de restricción parcial de este gen.

La figura 2 ilustra los residuos de aminoácidos conservados entre subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens* (SEC ID:NO 3) y *Bacillus lentus* (tipo salvaje) (SEC ID:NO 4).

45

Las figuras 3A y 3B ilustran la alineación de secuencias de aminoácidos de proteasas de tipo subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN'), *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (SEC ID:NO 5) y *Bacillus lentus*. El símbolo * indica la ausencia de residuos de aminoácidos específicos en comparación con la subtilisina de BPN'.

50 La figura 4 ilustra la respuesta aditiva de células T de 16 muestras de sangre mononuclear periférica a péptidos correspondientes a la proteasa de *Bacillus lentus* (GG36). El péptido E05 incluye la región que comprende los residuos correspondientes a 170-173 en proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

La figura 5 ilustra la respuesta aditiva de células T de 10 muestras de sangre mononuclear periférica a péptidos correspondientes a la molécula subtilisina humana. Los péptidos F10, F9, F8 y F7 contienen todos la secuencia de aminoácidos DQMD correspondiente a la región que comprende residuos correspondientes a 170-173 en proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens* en la alineación de secuencias de la figura 3.

55

Las figuras 6A y 6B/6C ilustran cadenas de aminoácidos correspondientes a péptidos derivados de la secuencia de la proteasa de *Bacillus lentus* y una subtilisina humana, respectivamente.

60

La figura 7 ilustra la secuencia de aminoácidos de la subtilisina humana (SEC ID:NO 6).

La figura 8 ilustra la alineación de una secuencia de aminoácidos de proteasa de BPN' (*Bacillus amyloliquefaciens*),
5 proteasa de SAVINASE (*Bacillus lentus*) y subtilisina humana (S2HSBT).

La figura 9 ilustra la respuesta de células T a péptidos derivados de proteasa de *Bacillus lentus* en una muestra tomada de un individuo que se sabe que es hipersensible a la proteasa de *Bacillus lentus*. El péptido E05 representa la región correspondiente a 170-173 en proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

10

La figura 10 ilustra la respuesta de células T a varias sustituciones de alanina en el grupo de péptidos E05 de la proteasa de *Bacillus lentus* en una muestra tomada de un individuo que se sabe que es hipersensible a la proteasa de *Bacillus lentus*.

15 La figura 11 ilustra la respuesta de células T a varias sustituciones de alanina en el grupo de péptidos E05 de la proteasa (una realización del epítipo de células T designaba una secuencia no modificada) en una muestra tomada de un individuo que se sabe que es hipersensible a la proteasa; también se muestran las secuencias para cada péptido.

20 La figura 12 ilustra el porcentaje de respondedores a la molécula de subtilisina humana.

La figura 13A ilustra la respuesta de células T de péptidos derivados de endoglucanasa de *Humicola insolens* (Número de acceso A23635). Los péptidos A02 y F06 representan la región correspondiente a los residuos 70-84 y 37-51, respectivamente, realizaciones del epítipo de células T, de endoglucanasa de *Humicola insolens*, donde la
25 secuencia de longitud completa se muestra en a figura 13B y A02 y F06 se muestran subrayados y en negrita.

La figura 14A ilustra la respuesta de células T a péptidos derivados de lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (Número de acceso AAC08588 y número PID g2997733). Los péptidos B02 y C06 representan las regiones correspondientes a los residuos 83-100 y 108-121, respectivamente, realizaciones del epítipo de células T, de lipasa de
30 *Thermomyces lanuginosa*, donde la secuencia de longitud completa se muestra en a figura 14B y B02 y C06 se muestran subrayados y en negrita.

La figura 15A ilustra la respuesta de células T a péptidos derivados de endo-beta N-acetilglucosaminidasa de *Streptomyces plicatus* (Número de acceso P04067). El péptido C06 representa la región correspondiente a los
35 residuos 126-140, una realización del epítipo de células T, de endo-beta N-acetilglucosaminidasa de *Streptomyces plicatus*, donde la secuencia de longitud completa se muestra en a figura 15B y C06 se muestra subrayado y en negrita.

La figura 16 ilustra la respuesta de células T a péptidos derivados de BPN' compilada para 22 individuos, donde se
40 indican las secuencias de epítipos de células T preferidas.

La figura 17 ilustra la respuesta de células T a péptidos derivados de GC36 compilada para 22 individuos, donde se indican las realizaciones de epítipos de células T, siendo preferidas GSISYPARYANAMAVGA y GAGLDIVAPGVNVQS.

45

La figura 18 es una realización de una proteína híbrida dada a conocer en la presente invención, donde el extremo N-terminal comprende la secuencia GG36 N-terminal y el extremo C-terminal comprende la secuencia de BPN' C-terminal y donde una comparación de las secuencias con las mostradas en la figura 8 indica que el híbrido formado omite los epítipos de células T preferidos de cada proteína.

50

La figura 19 es una comparación de títulos de ELISA para subtilisina de *B. Amyloliquefaciens* y la misma subtilisina pero modificada para contener un epítipo de células T de subtilisina de *B. Lentis*. La figura 19a representa el título a las 4 semanas; la figura 19b a las 6 semanas, la figura 19c a las 8 semanas y la figura 19d a las 10 semanas.

55 La figura 20 es un estudio de la evolución con el tiempo de títulos de ELISA para subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y la misma subtilisina pero modificada para contener un epítipo de células T de subtilisina de *B. Lentis*. La figura 20a representa el título para una dosis de 1 µg de enzima, figura 20b una dosis de 5 µg y figura 20c una dosis de 20 µg.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0021] Según la presente invención, se proporciona un método para identificar epítomos de células T. Además, se pueden identificar proteínas, incluyendo proteínas naturales que presentan epítomos de células T impotentes o potentes o sin epítomos de células T, según los métodos de la presente invención. De este modo, la presente invención permite la identificación y producción de proteínas que producen respuestas inmunogénicas según se desee, incluyendo proteínas naturales, así como proteínas que han sido mutadas para producir la respuesta apropiada. Se entiende que los términos proteína, polipéptido y péptido se utilizan a veces indistintamente en la presente invención. Cuando un péptido es una parte de proteína, el experto en la materia puede entender esto según el contexto en que se utiliza el término.

[0022] "Célula presentadora de antígeno" tal como se utiliza aquí significa una célula del sistema inmune que presenta antígenos en su superficie que es reconocible por receptores en la superficie de células T. Entre los ejemplos de células presentadoras de antígenos se encuentran las células dendríticas, células interdigitales, células B activadas y macrófagos.

[0023] "Proliferación de células T" tal como se utiliza aquí significa el número de células T producidas durante la incubación de células T con las células presentadoras de antígeno, con o sin antígeno.

[0024] "Proliferación de células T de la línea base" tal como se utiliza aquí significa la proliferación de células T que se observa normalmente en un individuo en respuesta a la exposición a células presentadoras de antígenos en ausencia de antígeno de péptido o proteína. Para los objetivos de la presente invención, el nivel de proliferación de células T en la línea base se determinó en base a una muestra para cada individuo como la proliferación de células T en respuesta a células presentadoras de antígeno en ausencia de antígenos.

[0025] "Epítomo de células T" significa una característica de un péptido o proteína que es reconocida por un receptor de células T en el inicio de una respuesta inmunogénica al péptido que comprende ese antígeno. El reconocimiento de un epítomo de células T por una célula T se cree en general que es a través de un mecanismo en el que las células T reconocen fragmentos de péptidos antigénicos que están unidos a moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I o clase II expresadas en células presentadoras de antígenos (véase, por ejemplo, Moeller, G. ed., "Antigenic Requirements for Activation of MHC-Restricted Responses," immunological Review, Vol. 98, p.187 (Copenhagen; Munksgaard) (1987).

[0026] "Muestra" tal como se utiliza aquí comprende células mononucleares que están intactas, es decir no sensibilizadas, al antígeno en cuestión.

[0027] "Homólogo" tal como se utiliza aquí significa una proteína o enzima que presenta una acción catalítica, estructura y/o uso que la proteína de interés. Para los objetivos de la invención, un homólogo y una proteína de interés no están necesariamente relacionados de manera evolutiva, por ejemplo, misma proteína funcional de diferente especie. Es deseable hallar un homólogo que tenga una estructura terciaria y/o primaria similar a la proteína de interés, ya que la sustitución del epítomo en la proteína de interés con un segmento análogo del homólogo reducirá la afectación del cambio. De este modo, enzimas estrechamente homólogas proporcionarán la fuente más deseable de sustituciones de epítomo. Alternativamente, si es posible, es ventajoso buscar análogos humanos para una proteína determinada. Por ejemplo, sustituir un epítomo específico en una subtilisina bacteriana con una secuencia de un análogo humano a subtilisina (es decir, subtilisina humana) debería dar lugar a una menor alergenicidad en la proteína bacteriana.

[0028] Se puede determinar una secuencia "análoga" asegurando que los aminoácidos de sustitución muestran una función similar, la estructura terciaria y/o residuos conservados con los aminoácidos en la proteína de interés en el epítomo o próximo al mismo. De este modo, cuando la región de epítomo contiene, por ejemplo, una estructura de hélice alfa o lámina beta, los aminoácidos de sustitución deberían mantener esa estructura específica.

[0029] Los epítomos determinados según el ensayo proporcionado aquí se pueden modificar entonces para reducir o aumentar el potencial inmunológico de la proteína de interés.

[0030] Preferiblemente, el epítomo se modifica de una de las siguientes maneras: (a) la secuencia de aminoácidos del epítomo se sustituye por una secuencia análoga de un homólogo humano a la proteína de interés; (b) la secuencia de aminoácidos del epítomo se sustituye por una secuencia análoga de un homólogo no humano a la proteína de interés, cuya secuencia análoga produce una respuesta inmunogénica, por ejemplo alérgica, inferior

debido al reconocimiento de epítomos de células T que la de la proteína de interés; (c) la secuencia de aminoácidos del epítomo se sustituye por una secuencia que mimetiza sustancialmente las características de la estructura terciaria principal del epítomo, pero que produce una respuesta inmunogénica, por ejemplo alérgica, inferior debido al reconocimiento de epítomos de células T que la de la proteína de interés; o (d) por cualquier secuencia que produce una respuesta inmunogénica, por ejemplo alérgica, inferior debido al reconocimiento de epítomos de células T que la de la proteína de interés.

5 **[0031]** Sin embargo, un experto en la materia reconocerá fácilmente que se pueden modificar epítomos de otras maneras dependiendo del resultado deseado. Por ejemplo, si se desea una vacuna de células T, se contempla que la secuencia de aminoácidos de un epítomo se sustituirá por aminoácidos que incrementan la respuesta inmunológica al péptido a través de una mayor unión a MHC y/o reconocimiento de células T. En otro ejemplo, si se desea alterar una respuesta inmune contra auto-antígenos, se contempla que la secuencia de aminoácidos de un epítomo se sustituirá por aminoácidos que disminuyen o causan un desplazamiento en una respuesta inflamatoria u otras respuestas inmunes.

10 **[0032]** El método de la presente invención se puede aplicar a todas las proteínas contra las que se desea modular la respuesta inmunogénica, por ejemplo, péptidos a utilizar como vacunas de células T, o péptidos o proteínas a utilizar como agentes terapéuticos contra, por ejemplo, el cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que las proteínas y péptidos de la presente invención no son necesariamente proteínas y péptidos nativos. De hecho, en una realización de la presente invención, el ensayo descrito aquí se utiliza para determinar la respuesta inmunológica de proteínas de genes barajados ("shuffled"). Para la descripción del barajado ("shuffling") de genes y la expresión de dichos genes, véase, Stemmer, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91: 10747 (1994); Patten, et al., Current Opinion in Biotechnol. 8:724 (1997); Kuchner & Arnold, Trends Biotechnol. 15:523 (1997); Moore, et al., J. Mol. Biol. 272:336 (1997); zhao, et al., Nature Biotechnol. 16:258 (1998); Giver, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:12809 (1998); Harayama, Trends Biotechnol. 16:76 (1998); Lin, et al., Biotechnol., Prog. 15:467 (1999); and Sun, J. Comput Biol 6:77 (1999). El ensayo se utiliza para predecir la respuesta inmunológica de proteínas codificadas por genes barajados. Una vez determinada, la proteína se puede alterar para modular la respuesta inmunológica a esa proteína.

20 **[0033]** Además de las proteínas y péptidos anteriores, la presente invención se puede utilizar para reducir la alergenicidad de proteínas. Estas proteínas incluyen, pero sin limitación, glucanasas, lipasas, celulasas, endoglucosidasas H (endo-H), proteasas, carbohidrasas, reductasas, oxidasas, isomerasas, transferasas, quinasas, fosfatasas, amilasas, etc. Además de reducir la alergenicidad a un animal, tal como un humano, de las secuencias de aminoácidos naturales, la presente invención comprende reducir la alergenicidad de una proteína humana mutada, por ejemplo, una proteína que se ha alterado para cambiar la actividad funcional de la proteína. En muchos casos, la mutación de proteínas humanas para, por ejemplo, aumentar la actividad, da lugar a la incorporación de nuevos epítomos de células T en la proteína mutada. El ensayo de la presente invención se puede utilizar para determinar la presencia del nuevo epítomo de células T y determinar aminoácidos sustitutos que reducirán la alergenicidad de la proteína mutada.

35 **[0034]** Aunque el método de la presente invención se puede aplicar a las proteínas anteriores y muchas otras, por simplicidad, a continuación se describirá una realización particularmente preferida de la invención, la modificación de la proteasa. Las proteasas son carbonil hidrolasas que generalmente actúan para romper enlaces peptídicos de proteína so péptidos. Tal como se utiliza aquí, "proteasa" significa una proteasa natural o una proteasa recombinante. Las proteasas naturales incluyen α -aminoacilpeptido hidrolasa, peptidilaminoácido hidrolasa, acilamino hidrolasa, serin carboxipeptidasa, metalocarboxipeptidasa, tiol proteinasa, carboxilproteinasa y metaloproteinasa. Se incluyen serin, metalo, tiol y ácido proteasas, así como endo y exo proteasas.

40 **[0035]** En una realización de la presente invención, se proporcionan polipéptidos híbridos. "Polipéptidos híbridos" son proteínas modificadas de por lo menos dos proteínas diferentes que son preferiblemente homólogas entre sí. Por ejemplo, un polipéptido híbrido preferido podría tener el extremo N-terminal de una proteína y el extremo C-terminal de un homólogo de la proteína. En una realización preferida, los dos extremos terminales se pueden combinar para corresponderse a la proteína activa de longitud completa. En una realización preferida, los homólogos comparten una similitud sustancial, pero no presentan epítomos de células T idénticos. Por lo tanto, en una realización, por ejemplo, un polipéptido de interés que tiene uno o más epítomos de células T en el extremo C terminal puede tener el extremo C-terminal sustituido por el extremo C-terminal de un homólogo que tiene un epítomo de células T menos potente en el extremo C-terminal, menos epítomos de células T o sin epítomo de células T en el extremo C-terminal. De este modo, el experto en la materia entiende que al ser capaz de identificar epítomos de células T entre homólogos, se pueden formar un conjunto de variantes que producen diferentes respuestas

inmunogénicas. Además, se entiende que se pueden utilizar las partes internas y más de un homólogo para producir las variantes de la presente invención.

[0036] Más generalmente, las variantes proporcionadas aquí se pueden derivar de la secuencia de aminoácidos precursora mediante la sustitución, delección, inserción o combinación de las mismas de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos precursora. Dicha modificación es preferiblemente de la "secuencia de ADN precursora" que codifica la secuencia de aminoácidos de la enzima precursora, pero puede ser mediante la manipulación de la proteína precursora. Los métodos adecuados para dicha manipulación de la secuencia de ADN precursora incluyen métodos descritos aquí, así como métodos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, las patentes y solicitudes EP 0 328299, WO89/06279 US ya referenciadas en la presente invención).

[0037] Las subtilisinas son proteasas bacterianas o fúngicas que actúan generalmente para romper enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se utiliza aquí, "subtilisina" significa una subtilisina natural o una subtilisina recombinante. Se sabe que un conjunto de subtilisinas naturales son producidas y a menudo secretadas por varias especies microbianas. Las secuencias de aminoácidos de los miembros de este conjunto no son completamente homólogas. Sin embargo, las subtilisinas de este conjunto muestran el mismo tipo de actividad proteolítica o similar. Esta clase de serin proteasas comparte una secuencia de aminoácidos en común que definen una triada catalítica que las diferencia de la clase relacionada con la quimiotripsina de serin proteasas. Las subtilisinas y las serin proteasas relacionadas con quimiotripsina presentan ambas una triada catalítica que comprende aspartato, histidina y serina. En las proteasas relacionadas con subtilisina, el orden relativo de estos aminoácidos, leyendo desde el extremo amino al extremo carboxilo, es aspartato-histidina-serina. En las proteasas relacionadas con quimiotripsina, el orden relativo, sin embargo, es histidina-aspartato-serina. De este modo, la subtilisina de la presente invención se refiere a una serin proteasa que tiene la triada catalítica de proteasas relacionadas con subtilisina. Entre los ejemplos se incluyen, pero sin limitación, subtilisinas identificadas en la figura 3 de la presente invención. En general y para los objetivos de la presente invención, la numeración de los aminoácidos en proteasas corresponde a los números asignados a la secuencia de subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* presentada en la figura 1.

[0038] "Recombinante", "subtilisina recombinante" o "proteasa recombinante" se refieren a una subtilisina o proteasa en que la secuencia de ADN que codifica la subtilisina o proteasa se modifica para producir una secuencia de ADN variante (o mutante) que codifica la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos natural. Entre los métodos adecuados para producir dicha modificación y que se pueden combinar con los descritos aquí, se incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos 4.760.025 (RE 34,606), la Patente de Estados Unidos 5.204.015 y la Patente de Estados Unidos 5.185.258.

[0039] Las "subtilisinas no humanas" y el ADN que las codifica se pueden obtener de muchos organismos procariotas y eucariotas. Ejemplos adecuados de organismos procariotas incluyen organismos gram negativos, tales como *E. coli* o *Pseudomonas* y bacterias gram positivas, tales como *Micrococcus* o *Bacillus*. Ejemplos de organismos eucariotas de los que se pueden obtener subtilisina y sus genes incluyen levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, hongos, tales como *Aspergillus sp.*

[0040] "Subtilisina humana" significa proteínas de origen humano que presentan actividad catalítica de tipo subtilisina, por ejemplo, la familia kexina de proteasas derivadas humanas. Un ejemplo de dicha proteína se representa por la secuencia de la figura 7. Adicionalmente, los derivados u homólogos de proteínas proporcionados aquí, incluyendo los de fuentes no humanas, tales como ratón o conejo, que mantienen la actividad esencial del péptido, tal como la actividad esencial del péptido, tal como la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos, etc., que presentan por lo menos un 50%, preferiblemente por lo menos un 65% y los más preferible por lo menos un 80%, más preferiblemente por lo menos un 90% y, algunas veces, como mucho un 95% ó 98% de homología con el polipéptido de interés. En una realización, el polipéptido de interés se muestra en las figuras.

[0041] Los números de las posiciones de aminoácidos utilizados en la presente invención se refieren a los asignados a la secuencia de subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* presentada en la figura 1. La presente invención, sin embargo, no se limita a la mutación de esta subtilisina particular, sino que se extiende a proteasas precursoras que contienen residuos de aminoácidos en posiciones que son "equivalentes" a los residuos particulares identificados en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. En una realización preferida de la presente invención, la proteasa precursora es la subtilisina de *Bacillus lentus* y las sustituciones, delecciones o inserciones se realizan en el residuo de aminoácido equivalente en *B. lentus* correspondiente a los indicados anteriormente.

[0042] Un residuo (aminoácido) de una proteasa precursora es equivalente a un residuo de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* si es homóloga (es decir, correspondiente en posición en estructura primaria o terciaria) o es

análoga a un residuo parte específica de ese residuo en subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (es decir, que tiene la misma capacidad funcional o similar para combinarse, reaccionar o interactuar químicamente). “Correspondiente”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere en general a una posición análoga a lo largo del péptido.

5

[0043] Con el fin de establecer homología con la estructura primaria, se compara directamente la secuencia de aminoácidos de una proteasa precursora con la secuencia primaria de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y particularmente con un grupo de residuos conocidos por ser invariantes en subtilisinas para las que se conoce la secuencia. Por ejemplo, la figura 2 de la presente invención muestra residuos conservados entre subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y subtilisina de *B. lentus*. Después de alinear los residuos conservados, permitiendo las necesarias inserciones y deleciones para mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de residuos conservados a través de deleciones e inserciones arbitrarias), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. El alineamiento de residuos conservados debería conservar preferiblemente el 100% de dichos residuos. Sin embargo, el alineamiento de más de un 75% o como mínimo un 50% de residuos conservados también es adecuado para definir residuos equivalentes. Para la conservación de la triada catalítica se debería mantener Asp32/His64/Ser221.

[0044] Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) y *Bacillus lentus* se puede alinear para proporcionar la máxima cantidad de homología entre las secuencias de aminoácidos. Una comparación de estas consecuencias muestra que existe un grupo de residuos conservados contenidos en cada secuencia. Los residuos conservados entre BPN' y *B. lentus* se identifican en la figura 2.

[0045] De este modo, estos residuos conservados se pueden utilizar para definir los correspondientes residuos de aminoácidos equivalentes de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en otras subtilisinas, tales como subtilisina de *Bacillus lentus* (Publicación PCT No. W089/06279 publicada el 13 de Julio de 1989), la enzima precursora de proteasa preferida de la presente invención, o la subtilisina referida como PB92 (EP 0 328 299), que es altamente homóloga con la subtilisina preferida de *Bacillus lentus*. Las secuencias de aminoácidos de ciertas de estas subtilisinas se alinean en las figuras 3A y 3B con la secuencia de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* para producir la máxima homología de residuos conservados. Tal como se puede observar, existe un grupo de deleciones en la secuencia de *Bacillus lentus* en comparación con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. De este modo, por ejemplo, el aminoácido equivalente para Val165 en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en las otras subtilisinas es isoleucina para *B. lentus* y *B. licheniformis*.

[0046] De este modo, por ejemplo, el aminoácido en la posición +179 es lisina (K) en las subtilisinas tanto de *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* y arginina (R) en *Savinasa*. En una realización de las variantes de proteasa de la invención, sin embargo, el aminoácido equivalente a +170 en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* está sustituido por ácido aspártico (D). Las abreviaturas y códigos de una letra para todos los aminoácidos en la presente invención cumplen con el Patentin User Manual (GenBank, Mountain View, CA) 1990, pág.101.

40

[0047] Las secuencias homólogas también se pueden determinar utilizando un “algoritmo de comparación de secuencias”. Se puede realizar un alineamiento óptimo de secuencias para la comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda para el método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual.

[0048] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST que se describe en Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente mediante National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar identificar parejas de secuencias de valoración elevada (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia en cuestión que se emparejan o satisfacen la valoración umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Estas coincidencias de palabras vecinas iniciales actúan como puntos de partida para encontrar HSP más largas que las contienen. Estas coincidencias de palabras se expanden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias que se comparan siempre y cuando se pueda aumentar la valoración acumulada de alineamiento. La extensión de las coincidencias de palabras se detiene cuando: la valoración acumulada de alineamiento desciende en una cantidad x desde un valor máximo conseguido; la valoración acumulada tiende a cero o inferior; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T,

60

y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, alineamientos (B) de la matriz de valoración BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) de 50, expectación (E) de 10, M'5, N'-4, y una comparación de ambas cadenas.

- 5 [0049] El algoritmo BLAST realiza a continuación un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Kariin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci USA 90:5873-5787 (1993)). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)) que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría de casualidad. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos se considera similar a una proteína, tal como
- 10 una proteasa, si la probabilidad de la suma más pequeña en comparación de la secuencia de aminoácidos de prueba con una proteína, tal como una secuencia de aminoácidos de proteasa, es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01, y lo más preferible inferior a aproximadamente 0,001.

- [0050] "Residuos equivalentes" también se pueden definir determinando la homología a nivel de estructura terciaria para una proteína precursora, cuya estructura terciaria se ha determinado mediante cristalografía de rayos X. Los
- 15 residuos equivalentes se definen como aquellos para los que las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido particular de la proteína precursora, tal como la proteasa y subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están en 0,13 nm y preferiblemente 0,1 nm después del alineamiento. El alineamiento se consigue después de orientar el mejor modelo y posicionarlo
- 20 para producir el máximo solapamiento de coordenadas atómicas de átomos de proteína que no son hidrógeno de la proteína, tal como la proteasa en cuestión con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. El mejor modelo es el modelo cristalográfico que produce el factor R más bajo para los datos de difracción experimental en la resolución más elevada posible.

- 25 [0051] Los residuos equivalentes que son funcionalmente análogos a un residuo específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se definen como aquellos aminoácidos de la proteína precursora, tal como una proteasa, que pueden adoptar una conformación de manera que alteran, modifican o contribuyen a la estructura de la proteína, la unión a sustrato o catálisis de una manera definida y atribuida a un residuo específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Además, son aquellos residuos de la proteína precursora, por ejemplo, proteasa (para la que se
- 30 ha obtenido la estructura terciaria mediante cristalografía de rayos X), que ocupan una posición análoga hasta el punto de que, aunque los átomos de la cadena principal del residuo determinado pueden no satisfacer el criterio de equivalencia en base a la ocupación de una posición homóloga, las coordenadas atómicas de por los menos dos de los átomos de la cadena lateral del residuo se encuentran a 0,13 nm de los átomos de la cadena lateral correspondiente de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Las coordenadas de la estructura tridimensional de
- 35 subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se establecen en la publicación EP No. 0 251 446 (equivalente a la Patente de Estados Unidos 5.182.204) y se puede utilizar tal como se ha indicado anteriormente para determinar los residuos equivalentes a nivel de estructura terciaria.

- [0052] Algunos de los residuos identificados para la sustitución, inserción o delección son residuos conservados,
- 40 mientras otros que no están. En el caso de residuos que no son conservados, la sustitución de uno o más aminoácidos se limita a sustituciones que producen una variante que presenta una secuencia de aminoácidos que no corresponde con la de la naturaleza. En el caso de residuos conservados, dichas sustituciones no deberían dar lugar a una secuencia natural. Las variantes de la presente invención incluyen las formas maduras de variantes de proteínas, así como las formas pro- y prepro- de dichas variantes de proteínas. Las formas prepro- son la
- 45 construcción preferida, ya que esto facilita la expresión, secreción y maduración de las variantes de proteínas.

- [0053] La "prosecuencia" se refiere a una secuencia de aminoácidos unidos a la parte N-terminal de la forma madura de una proteína que cuando se elimina da lugar a la aparición de la forma "madura" de la proteína. Muchas enzimas
- 50 proteolíticas se hallan en la naturaleza como productos de proenzimas traduccionales y, en ausencia del proceso post-traducciona, se expresan de esta manera. Una prosecuencia preferida para la producción de variantes de proteína, tal como variantes de proteasa, es la posible prosecuencia de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, aunque se pueden utilizar otras prosecuencias.

- [0054] Una "secuencia señal" o "presecuencia" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos unida a la parte N-
- 55 terminal de una proteína o a la parte N-terminal de una proproteína que puede participar en la secreción de las formas madura o pro de la proteína. Esta definición de secuencia señal es funcional, lo que significa que incluye todas las secuencias de aminoácido codificadas por la parte N-terminal del gen de proteína que participan en la realización de la secreción de la proteína en condiciones nativas. La presente invención utiliza dichas secuencias para realizar la secreción de las variantes de proteína tal como se definen aquí. Una posible secuencia señal

comprende los primeros siete residuos de aminoácidos de la secuencia señal de subtilisina de *Bacillus subtilis* fusionada al resto de la secuencia señal de subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

5 **[0055]** Una forma "repro" de una variante de proteína consiste en la forma madura de la proteína que tiene una prosequencia unida operativamente al extremo amino de la proteína y una secuencia "pre" o "señal" unida operativamente al extremo amino de la prosequencia.

10 **[0056]** "Vector de expresión" se refiere a una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está unida operativamente a una secuencia control adecuada capaz de realizar la expresión de dicho ADN en un huésped adecuado. Dichas secuencias control incluyen un promotor para realizar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión a ribosomas de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula fago o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un huésped adecuado, el vector se puede replicar y actuar de manera independiente del genoma huésped, o puede integrarse, 15 en algunos casos, en el propio genoma. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se utilizan a veces de manera indistinta, ya que el plásmido es la forma de vector utilizado más habitualmente en la actualidad. Sin embargo, la presente invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión que realizan funciones equivalentes y que son conocidas en la técnica o se conocerán.

20 **[0057]** Las "células huésped" utilizadas en la presente invención son en general huéspedes procariotas o eucariotas que preferiblemente se han manipulado mediante los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos 4.760.025 (RE 34,606) para hacerlos incapaces de secretar endoproteasa enzimáticamente activa. Una célula huésped preferida para expresar proteína es la cepa BG2036 de *Bacillus* que es deficiente en proteína neutra enzimáticamente activa y proteasa alcalina (subtilisina). La construcción de la cepa BG2036 se describe en detalle 25 en la Patente de Estados Unidos 5.264.366. Otras células huésped para expresar proteínas incluyen *Bacillus subtilis* 1168 (también descrita en la Patente de Estados Unidos 4.760.025 (RE 34,606) y la Patente de Estados Unidos 5.264.366), así como cualquier cepa de *Bacillus* adecuada, tal como *B. licheniformis*, *B. lentus*, etc.

30 **[0058]** Las células huésped se transforman o transfectan con los vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinante. Estas técnicas se pueden hallar en cualquier guía práctica de biología molecular, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Springs Harbor Publishing (1989) ("Sambrook"); y *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. (eds.), Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1997 Supplement) ("Ausubel"). Dichas células huésped transformadas son capaces de replicar vectores que codifican las variantes de proteínas o expresar 35 la variante de proteína deseada. En el caso de vectores que codifican la forma pre- o la forma prepro- de la variante de proteína, dichas variantes, cuando se expresan, se secretan habitualmente de la célula huésped al medio de la célula huésped.

40 **[0059]** "Unida operativamente", cuando se describe la relación entre dos regiones de ADN significa simplemente que están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, una prosequencia está unida operativamente a un péptido si funciona como secuencia señal, participando en la secreción de la forma madura de la proteína implicando muy probablemente la separación de la secuencia señal. Un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una 45 secuencia codificante si está colocado para permitir la traducción.

50 **[0060]** Los genes que codifican la proteína precursora natural se pueden obtener de acuerdo con los métodos generales conocidos por los expertos en la materia. Los métodos comprenden en general sintetizar sondas marcadas que tienen potenciales secuencias que codifican regiones de la proteína de interés, preparar bibliotecas genómicas de organismos que expresan la proteína, y cribar las bibliotecas para el gen de interés mediante la hibridación con las sondas. A continuación los clones de hibridación positiva se localizan y se secuencian.

55 **[0061]** "Hibridación" se utiliza para analizar si un fragmento de ADN o gen determinado corresponde con una secuencia de ADN descrita en la presente invención y, de este modo, se encuentra en el alcance de la presente invención. Las muestras a hibridar se pasan por electroforesis a través de un gel de agarosa (por ejemplo, agarosa al 0,8%), de manera que se puede visualizar la separación de los fragmentos de ADN por el tamaño. Los fragmentos de ADN se visualizan normalmente mediante tinción con bromuro de etidio. El gel se pueden enjuagar brevemente en H₂O destilada y posteriormente se despurina en una solución apropiada (tal como, por ejemplo, HCl 0,15 M) con 60 agitación suave seguido de desnaturalización durante 30 minutos (en, por ejemplo, NaOH 0,4 M) con agitación suave. SE puede incluir una etapa de renaturalización en la que el gel se coloca en NaCl 1,5 M, Tris 1 M, pH 7,0 con agitación suave durante 30 minutos.

[0062] A continuación, el ADN debería transferirse a una membrana apropiada cargada positivamente, por ejemplo, una membrana Maximum Strength Nytran Plus (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.), utilizando una solución de transferencia (tal como, por ejemplo, 6XSSC (NaCl 900 mM, citrato de trisodio 90 mM)). Una vez se completa la transferencia, generalmente después de aproximadamente 2 horas, la membrana se enjuaga en, por ejemplo, 2X SSC (2X SSC = NaCl 300 mM, citrato de trisodio 30 mM) y se seca al aire a temperatura ambiente. A continuación, la membrana debería prehibridarse (durante aproximadamente 2 horas o más) en una solución de prehibridación adecuada (tal como, por ejemplo, una solución acuosa que contiene por cada 100 mL: 20-50 mL de formamida, 25 mL de 20X SSPE (1X SSPE = NaCl 0,18 M, EDTA 1 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,7), 2,5 mL de SDS al 20%, y 1 mL de ADN de esperma de salmón o arenque fragmentado 10 mg/mL). Tal como sabría un experto en la materia, la cantidad de formamida en la solución de prehibridación puede variarse dependiendo de la naturaleza de la reacción obtenida según los métodos de rutina. De este modo, una cantidad inferior de formamida puede dar lugar a una hibridación más completa en cuanto a la identificación de moléculas que se hibridan con respecto al mismo procedimiento utilizando una mayor cantidad de formamida. Por otro lado, se pueden identificar visualmente más fácilmente una banda intensa de hibridación mediante la utilización de más formamida.

[0063] Se marca una sonda de ADN que es complementaria o casi complementaria a la secuencia de ADN de interés y tiene generalmente entre 100 y 1000 bases de longitud (utilizando, por ejemplo, el sistema de marcaje Megaprime según las instrucciones del fabricante) para incorporar ³²P en el ADN. La sonda marcada se desnaturaliza mediante calentamiento hasta 95°C durante 5 minutos e inmediatamente se añade a la membrana y la solución de prehibridación. La reacción de hibridación debería proceder durante un tiempo apropiado y bajo condiciones apropiadas, por ejemplo, durante 18 horas a 37°C con agitación o rotación suave. La membrana se enjuaga (por ejemplo, en 2X SSC/SDS al 0,3%) y, a continuación, se lava en una solución de lavado adecuado con agitación suave. La rigurosidad deseada será un reflejo de las condiciones bajo las que se lava la membrana (filtro).

[0064] Específicamente, la rigurosidad de una reacción determinada (es decir, el grado de homología necesaria para una hibridación satisfactoria) dependerá de las condiciones de lavado a las que se somete el filtro después de la hibridación. Las condiciones de "rigurosidad baja" tal como se definen aquí comprenderán lavar un filtro con una solución de 0,2X SSC/SDS al 0,1 % a 20°C durante 15 minutos. Las condiciones de "alta rigurosidad" comprenden una etapa de lavado adicional que comprende lavar el filtro una segunda vez con una solución de 0,2X SSC/SDS al 0,1 % a 37°C durante 30 minutos.

[0065] Después de lavarse, la membrana se seca y se detecta la sonda unida. Si se utiliza ³²P u otro radioisótopo como agente marcador, la sonda unida se puede detectar mediante autorradiografía. Otras técnicas para la visualización de otras sondas so conocidas por los expertos en la materia. La detección de una sonda unida indica una secuencia de ácidos nucleicos que tiene la homología deseada y está comprendida en la invención.

[0066] La proteína clonada se utiliza a continuación para transformar una célula huésped con el fin de expresar la proteína. El gen de la proteína se une a continuación a un plásmido con un número de copias elevado. Este plásmido se replica en huéspedes en el sentido de que contiene los elementos bien conocidos necesarios para la replicación del plásmido: un promotor unido operativamente al gen en cuestión (que se puede suministrar como el propio promotor homólogo del gen si es reconocido, es decir, transcrito por el huésped), una región de terminación de la transcripción y una región de poliadenilación (necesaria para la estabilidad del ARNm transcrito por el huésped del gen de la proteína en ciertas células huésped eucariotas) que es exógeno o es suministrada por la región terminadora endógena del gen de la proteína y, de manera deseable, un gen de selección, tal como un gen de resistencia a antibiótico que permite el mantenimiento continuo del cultivo de células huésped infectadas de plásmido mediante el crecimiento en medio que contiene antibiótico. Los plásmidos con un número de copias elevado también contienen un origen de replicación para el huésped, permitiendo así que se generen grandes cantidades de plásmidos en el citoplasma sin limitaciones cromosómicas. Sin embargo, se encuentra en el alcance de la invención integrar múltiples copias del gen de proteína en el genoma del huésped. Esto se facilita por los organismos procariontes y eucariotas que son particularmente susceptibles de recombinación homóloga.

[0067] En una realización, el gen puede ser un gen natural, tal como el de *B. lentus* o *B. amyloliquefaciens*. Alternativamente, se puede producir un gen sintético que codifica una proteína precursora natural o mutante. En dicha estrategia, se determina la secuencia de ADN y/o aminoácidos de la proteína precursora. A continuación, se sintetizan múltiples fragmentos de ADN de cadena sencilla sintético solapante, que, a continuación, tras la hibridación y unión producen un ADN sintético que codifica la proteína precursora. Un ejemplo de construcción de genes sintéticos se establece en el ejemplo 3 de la Patente de Estados 5.204.015.

[0068] Una vez se ha clonado el gen de la proteína precursora natural o sintética, se realizan un conjunto de modificaciones para potenciar el uso del gen más allá de la síntesis de la proteína precursora natural. Dicha modificación incluye la producción de proteínas recombinantes tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 4.760.025 (RE 34,606) y la Publicación EPO No. 0 251446 y la producción de variantes de proteínas
5 descritas aquí.

[0069] Se puede utilizar el siguiente método de mutagénesis de cassette para facilitar la construcción de las variantes de proteína de la presente invención, aunque se pueden utilizar otros métodos. En primer lugar, el gen natural que codifica la proteína se obtiene y secuencia de manera total o parcial. A continuación, la secuencia se
10 rastrea para un punto en el que se desea realizar una mutación (delección, inserción o sustitución) de uno o más aminoácidos en la enzima codificada. Las secuencias que flanquean este punto se evalúan por la presencia de sitios de restricción para sustituir un segmento corto del gen por un conjunto de oligonucleótidos que cuando se expresan codificarán varios mutantes. Dichos sitios de restricción son preferiblemente sitios únicos en el gen de proteína para
15 facilitar la sustitución del segmento de gen. Sin embargo, se puede utilizar cualquier sitio de restricción conveniente que no sea demasiado redundante en el gen de proteína, siempre que los fragmentos génicos generados por la digestión por restricción se pueden reensamblar en la secuencia correcta. Si los sitios de restricción no están presentes en posiciones a una distancia conveniente desde el punto seleccionado (de 10 a 15 nucleótidos), dichos sitios se generan sustituyendo nucleótidos en el gen de manera que ni el marco de lectura ni los aminoácidos
20 codificados cambian en la construcción final. La mutación del gen con el fin de cambiar su secuencia para cumplir con la secuencia deseada se realiza mediante la extensión con el cebador M13 de acuerdo con los métodos generalmente conocidos. La tarea de localizar regiones flanqueantes adecuadas y evaluar los cambios necesarios para llegar a dos sitios de restricción convenientes se realiza por rutina mediante la redundancia del código genético, un mapa de enzimas de restricción y una gran cantidad de diferentes enzimas de restricción. Cabe indicar que si
25 está disponible un sitio de restricción flanqueante conveniente, el método anterior necesita utilizarse sólo en relación con la región flanqueante que no contiene un sitio.

[0070] Una vez se clona el AND natural o el ADN sintético, se digieren los sitios de restricción que flanquean las posiciones a mutar con las enzimas de restricción afines y se unen en el gen un conjunto de cassettes de oligonucleótidos complementarios en los extremos terminales. La mutagénesis se simplifica mediante este método
30 porque todos los oligonucleótidos se pueden sintetizar para tener los mismos sitios de restricción y no son necesarios enlazadores sintéticos para crear los sitios de restricción.

[0071] En un aspecto de la invención, el objetivo es asegurar una variante de proteína que tenga un potencial alérgico alterado en comparación con la proteína precursora, ya que disminuir dicho potencial permite un uso más
35 seguro de la enzima. Mientras que la presente invención es útil para disminuir el potencial alérgico, las mutaciones especificadas aquí se pueden utilizar en combinación con mutaciones conocidas en la técnica para dar lugar a una estabilidad térmica alterada y/o una especificidad de sustrato alterada, actividad modificada o estabilidad alcalina alterada en comparación con el precursor.

[0072] Los métodos de la presente invención se pueden referir a alterar la capacidad del epítipo de células T que incluye las posiciones de residuos 170-173 en *Bacillus lentus* para inducir la proliferación de células T. La modificación se puede realizar a cualquiera de R170D, Y171Q y/o N173D o todos ellos. De manera similar, tal como se describe en detalle anteriormente, se cree que la modificación de los residuos correspondientes en cualquier proteína dará lugar a la neutralización de un epítipo de células T clave en esa proteína. De este modo, en
45 combinación con las mutaciones descritas aquí en la región correspondiente a los residuos de aminoácidos 170-173, se pueden utilizar sustituciones en las posiciones correspondientes a N76D/S103A/V104I/G159D opcionalmente en combinación con una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones correspondientes a V68A, T213R, A232V, Q236H, Q246R, y T260A de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Además de disminuir el potencial alérgico de la variante de proteína de la invención, para modular la estabilidad global y/o la actividad
50 proteolítica de la enzima. De manera similar, estas sustituciones se pueden combinar con una mutación en la Asparagina (N) en la subtilisina de *Bacillus lentus* en la posición equivalente +76 a Aspartato (D) en combinación con las mutaciones S103A/V104I/G159D y opcionalmente en combinación con una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones correspondientes a V68A, T213R, A232V, Q236H, Q245R, y T260A de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, para producir una mayor estabilidad y/o una mayor actividad de la enzima
55 mutante resultante.

[0073] Las variantes particulares incluyen las siguientes combinaciones específicas de residuos sustituidos correspondientes a las posiciones:
N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D;
60 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171O/S173D/Q236H;

V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/Q236H/Q245R;
 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/A232V/Q236H/Q245R; y
 V68A/N76D//S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/T213R/A232V/Q236H/

5 Q245R/T260A de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Estas sustituciones se realizan preferiblemente en
 10 subtilisina de *Bacillus lentus* (recombinante o de tipo nativo), aunque las sustituciones se pueden realizar en
 cualquier proteína de Bacillus.

[0074] En base a los resultados de cribado obtenidas con las variantes de proteínas, las mutaciones indicadas
 anteriormente en subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* son importantes para la actividad proteolítica, acción y/o
 10 estabilidad de estas enzimas y la acción de limpieza o lavado de dichas enzimas variantes.

[0075] Muchas de las variantes de proteínas son útiles en la formulación de varias composiciones de detergentes.
 Un conjunto de compuestos conocidos son tensoactivos adecuados útiles en composiciones que comprenden las
 proteínas mutantes. Estos incluyen detergentes no iónicos, aniónicos, catiónicos, aniónicos o zwitteriónicos, tal como
 15 se describen en US 4.404.128 de Barry J. Anderson y US 4.261.868 de Jiri Flora, et al. Una formulación de
 detergente adecuada es la que describe en el ejemplo 7 de la Patente de Estados Unidos 5.204.015. La técnica es
 familiar con las diferentes formulaciones que se pueden utilizar como composiciones de limpieza. Además de las
 20 composiciones de limpieza habituales, se entiende fácilmente que se pueden utilizar variantes de proteínas para
 cualquier objetivo que utilice proteínas nativas o de tipo salvaje. De este modo, se pueden utilizar estas variantes,
 por ejemplo, en aplicaciones de jabón de barra o líquido, formulaciones de lavavajillas, soluciones o productos de
 limpieza de lentes de contacto, hidrólisis peptídica, tratamiento de residuos, aplicaciones textiles, como enzimas de
 separación por fusión en la producción de proteínas, etc. Las variantes pueden comprender, además de una mejor
 25 alergenidad, una mayor acción en una composición de detergente (en comparación con el precursor). Tal como se
 utiliza aquí, una mayor acción en un detergente se define como el aumento de la limpieza de ciertas manchas
 sensibles a enzimas, tales como césped o sangre, tal como se determina mediante evaluación habitual después de
 un ciclo de lavado estándar.

[0076] Las proteínas, particularmente proteasas, se pueden formular en detergentes en polvo y líquidos conocidos,
 que tienen un pH ente 6,5 y 12,0 a niveles de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5% (preferentemente 1%
 30 a 5%) en peso. Estas composiciones de limpieza detergentes también pueden incluir otras enzimas, tales como
 proteasas, amilasas, celulasas, lipasas o endoglicosidasas conocidas, así como "builders" y estabilizantes.

[0077] La adición de proteínas, particularmente proteasas, a composiciones de limpieza convencionales no crean
 ninguna limitación de uso especial. En otras palabras, cualquier temperatura y pH adecuados para el detergente
 35 también son adecuados para las presentes composiciones siempre que el pH esté dentro del intervalo anterior y la
 temperatura por debajo de la temperatura desnaturante de la proteína descrita. Además, se pueden utilizar
 proteínas en una composición de limpieza sin detergentes, de nuevo solas o en combinación con "builders" y
 estabilizantes.

40 [0078] Las variantes de proteínas se pueden incluir en la alimentación para animales, tales como parte de aditivos
 para alimento para animales tal como se describe en, por ejemplo, US 5.612.055; US 5.314.692; y US 5.147.642.

[0079] Las variantes de proteínas se pueden utilizar para tratar, por ejemplo, seda o lana, tal como se describe en
 45 publicaciones, tales como RD 216.034; EP 134.267; US 4.533.359; y EP 344.259.

[0080] Las variantes se pueden cribar por la actividad proteolítica según métodos conocidos en la técnica. Un
 experto en la materia reconocerá fácilmente que se determinarán los usos de proteínas, en gran parte, sobre las
 propiedades inmunológicas de las proteínas. Por ejemplo, las enzimas que muestran una alergenidad reducida se
 50 pueden utilizar en composiciones de limpieza. "Composiciones de limpieza" son composiciones que se pueden
 utilizar para eliminar compuestos no deseados de sustratos, tales como tejidos, platos, lentes de contacto, otros
 sustratos sólidos, pelo (champú), piel (jabones y cremas), etc. Las proteínas, en particular celulasas, proteasas y
 amilasas, con una alergenidad reducida, también se pueden utilizar en el tratamiento de tejidos. El "tratamiento
 textil" comprende un proceso en el que los tejidos, hilos o fibras individuales que se pueden tejer, fieltar o tricotar en
 tejidos o prendas se tratan para realizar una característica deseada. Ejemplos de dichas características deseadas
 55 son "lavado a la piedra", eliminar pelusas, eliminar pelo, "desizing", suavizar y otros tratamientos textiles conocidos
 por los expertos en la materia.

[0081] Los métodos de la presente invención se pueden aplicar a proteínas terapéuticas contra las que los
 individuos preparan una respuesta inmune, en particular, los individuos que carecen de producción endógena de la
 60 proteína son susceptibles de formar anticuerpos neutralizantes y ser retráctil al tratamiento. Así mismo, las

modificaciones de una proteína pueden introducir nuevos epítomos que son potencialmente inmunogénicos. Los métodos de la invención se pueden utilizar para identificar y modificar epítomos en, por ejemplo, el factor VIII humano, para evitar respuestas neutralizantes.

- 5 [0082] Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar de varias formas, tales como gránulos, comprimidos, pastillas, supositorios, cápsulas, suspensiones, bálsamos, lociones y similares. Los portadores y/o diluyentes orgánicos o inorgánicos de grado farmacéutico adecuados para el uso oral y tópico se pueden utilizar para componer composiciones que contienen los compuestos terapéuticamente activos. Entre los diluyentes conocidos en la técnica se incluyen medio acuoso, aceites y grasas vegetales y animales. Como agentes auxiliares se pueden utilizar agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes para variar la presión osmótica o tampones para asegurar un valor de pH adecuado y aumentadores de la penetración en la piel. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más de los siguientes: portador de proteínas, tales como albúmina sérica; tampones; rellenos, tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglutinantes, edulcorantes y otros agentes aromatizantes; agentes colorantes; y polietilenglicol. Los aditivos son conocidos en la técnica y se utilizan en una serie de formulaciones.

[0083] Lo siguiente se presenta a modo de ejemplo y no debe interpretarse como una limitación en el alcance de las reivindicaciones.

20 EJEMPLO

Ejemplo 1

Ensayo para la identificación de epítomos de células T de péptido utilizando células T humana intactas

- 25 [0084] Se recogieron células de sangre periférica humana nueva de humanos "intactos", es decir personas no expuestas o sensibles a proteasa de *Bacillus lentus*, para la determinación de epítomos antigénicos en proteasa de *Bacillus lentus* y subtilisina humana. Por humanos intactos se pretende dar a entender que el individuo no ha sido expuesto o ha desarrollado una reacción a proteasa en el pasado. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (almacenadas a temperatura ambiente, no más de 24 horas) para uso de la siguiente manera: se llevaron aproximadamente 30 ml de una solución de preparación de una capa leuco-plaquetaria de una unidad de sangre completa a 50 ml con solución tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y se separaron en dos tubos. Las muestras se suplementaron con 12,5 ml de un medio de separación por densidad linfoprep a temperatura ambiente (densidad Nycomed 1,077 g/ml). Los tubos se centrifugaron durante treinta minutos a 600 G. Se recogió la interfase de las dos fases, se juntó y se lavó con DPBS. La densidad celular de la solución resultante se midió mediante un hemocitómetro. La viabilidad se midió mediante exclusión con azul tripano.

- 35 [0085] A partir de la solución resultante, se preparó un cultivo de células dendríticas diferenciadas a partir de la muestra de células mononucleares de sangre periférica que tenía una densidad de 10^8 células por 75 ml de matraz de cultivo en una solución de la siguiente manera:

- (1) se suplementaron 50 ml de medio AIM V libre de suero (Gibco) con una dilución 1:100 de beta-mercaptoetanol (Gibco). Los matraces se dejaron planos durante dos horas a 37°C en CO₂ al 5% para permitir la adherencia de monocitos a la pared del matraz.
- 45 (2) La diferenciación de las células monocitos a células dendríticas fue de la siguiente manera: se extrajeron las células no adherentes y las células adherentes resultantes (monocitos) se combinaron con 30 ml de AIM V, 800 unidades /ml de GM-CSF (Endogen) y 500 unidades/ml de IL-4 (endogen); la mezcla resultante se cultivó durante 5 días bajo condiciones a 37°C en CO₂ al 5%. Después de cinco días, se añadió citoquina TNFa (endogen) hasta 0,2 unidades/ml, y la citoquina IL-1a (endogen) se añadió hasta una concentración final de 50 unidades/ml y la mezcla se incubó a 37°C en CO₂ al 5% durante dos días más.
- 50 (3) En el séptimo día, se añadió Mitomicina C a una concentración de 50 microgramos/ml para detener el crecimiento del cultivo de células dendríticas ahora diferenciadas. La solución se incubó durante 60 minutos a 37°C en CO₂ al 5%. Las células dendríticas se recogieron mediante rascado suave de las células adherentes para sacarlas del fondo del matraz mediante un rascador celular. A continuación, se centrifugaron las células adherentes y no adherentes a 600G durante 5 minutos, se lavaron en DPBS y se contaron.
- 55 (4) Las células dendríticas preparadas se colocaron en un array de base redonda de 96 pocillos a 2×10^4 /pocillo en 100 microlitros de volumen total de medio AIM V.

- [0086] Se prepararon células T CD4+ a partir de alícuotas congeladas de las muestras de células de sangre periférica utilizadas para preparar las células dendríticas utilizando el Kit Collect de CD4+ humanas (Biotex) según

las instrucciones del fabricante con la siguiente modificación: las alícuotas se descongelaron y se lavaron de manera que aproximadamente 10^8 células se aplicarán por columna Collect; las células se resuspendieron en 4 ml de DPBS y 1 ml del reactivo Cell del kit Collect, la solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos. La solución resultante se centrifugó durante cinco minutos a 600G a temperatura ambiente y el residuo celular se resuspendió en 2 ml de DPBS y se aplicó a las columnas Collect. El efluente de las columnas se recogió en suero humano al 2% en DPBS. La solución de células CD4+ resultante se centrifugó, se resuspendió en medio AIMV y se contó la densidad.

5
10 [0087] La suspensión de células T CD4+ se resuspendió hasta un recuento de 2×10^6 /ml en medio AIM V para facilitar una manipulación eficiente de la placa de 96 pocillos.

[0088] Se prepara antígeno peptídico de una solución madre 1 M en DMSO mediante dilución en medio AIM V en una proporción 1:10. Se colocan 10 microlitros de la solución madre en cada pocillo de la placa de 96 pocillos que contienen las células dendríticas diferenciadas. A continuación se añaden a cada pocillo 100 microlitros de la solución de células T CD4+ diluidas preparada anteriormente. Los controles útiles incluyen blancos de DMSO diluidos y controles positivos de toxoide del tétanos.

[0089] Las concentraciones finales en cada pocillo, a un volumen total de 210 microlitros, son las siguientes:
 2×10^4 CD4+
 2×10^5 células dendríticas (R:S de 10:1)
 5 mM péptido

Ejemplo 2

25 Identificación de epítomos de células T en proteasa de subtilisina de *Bacillus lentus* y humana

[0090] Los péptidos para utilizar en el ensayo descrito en el ejemplo 1 se prepararon en base a la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus lentus* y humana. Los antígenos peptídicos se diseñaron de la siguiente manera. A partir de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de subtilisina humana o proteasa de *Bacillus lentus* proporcionada en la figura 1, se prepararon sintéticamente grupos de 15 unidades, cada grupo de 15 unidades se solapaba con el anterior y el posterior grupo de 15 unidades a excepción de tres residuos.

[0091] Los péptidos utilizados corresponden a tramos de residuos de aminoácidos en *Bacillus lentus* proporcionados en la figura 8, y péptidos correspondientes con residuos de aminoácidos en subtilisina humana proporcionada en la figura 7. Los péptidos utilizados correspondientes a las proteasas se proporcionan en la figura 6. Todos los análisis descritos mostraron respuestas robustas de control positivo al toxoide antígeno del tétanos. Las respuestas se promediaron con cada experimento, a continuación se normalizaron con respecto a la respuesta en la línea base. Se registró un suceso positivo si la respuesta era por lo menos tres veces la respuesta en la línea base.

40 [0092] La respuesta inmunogénica (es decir, proliferación de células T) con respecto a los péptidos preparados a partir de subtilisina humana y *Bacillus lentus* coincidían y se proporciona en las figuras 4 y 5, respectivamente. La proliferación de células T se midió mediante el método de tritio incorporado. Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5 como comparación de la respuesta aditiva inmunogénica en 10 individuos (figura 4) y 16 individuos (figura 5) con respecto a diversos péptidos. La respuesta se indica como la respuesta añadida en la que 1,0 es igual a la respuesta de la línea base para cada muestra. De este modo, en la figura 4, una lectura de 10,0 o inferior es la respuesta de la línea base y en la figura 5 una lectura de 16,0 o inferior es la respuesta de la línea base. Cuanto mayor es la respuesta, más potente se considera el epítomo de células T.

50 [0093] Tal como se indica en las figuras 4 y 5, la respuesta inmunogénica de las muestras de sangre intactas de individuos no sensibilizados mostró una respuesta alérgica en el fragmento peptídico de *Bacillus lentus* correspondiente a los residuos 170-173 de proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. Tal como se esperaba, el fragmento correspondiente en la subtilisina humana provoca únicamente respuesta de la línea base.

55 [0094] La figura 9 muestra la respuesta de células T a péptidos derivados de proteasa de *Bacillus lentus* en una muestra tomada de un individuo que se sabe que es hipersensible a proteasa de *Bacillus lentus*. El péptido E05 representa la región correspondiente a 170-173 en proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. Tal como se muestra en la figura 9, el individuo hipersensible era altamente sensible al epítomo de células T representado por el péptido E05. Esto confirma que, mediante la realización del ensayo según la presente invención, es posible predecir los epítomos principales identificados por las células T de un individuo hipersensible.

60

- [0095] La figura 10 muestra la respuesta de células T a varias sustituciones de alanina en el péptido E05 de proteasa de *Bacillus lentus* en una muestra tomada de un individuo que se sabe que es hipersensible a la proteasa de *Bacillus lentus*. Se utilizaron sustituciones de alanina como sustituciones con el objetivo de determinar el papel de cualquier residuo específico en el epítipo. La leyenda de la figura 10 se refiere a la posición del péptido en la que se sustituyó una alanina, es decir en el péptido E06 (secuencia GSISYPARYANAMAV), G a A=2, S a A=3, I a A=4, S a A=5, Y a A=6, P a A=7, R a A=8, Y a A=9, N a A=10, M a A=11 y V a A=12. Tal como se indica en la figura 10, la sustitución de cualquiera de los residuos R170A, Y171A y/o N173A en la proteasa de *Bacillus lentus* da lugar a una respuesta espectacularmente reducida en la muestra de sangre del individuo hipersensible.
- 10 [0096] A partir de estos resultados, es evidente que los residuos 170, 171 y 173 son ampliamente responsables del inicio de la reacción alérgica en la proteasa de *Bacillus lentus*.

Ejemplo 3

- 15 Identificación de epítipos de células T en celulasa de *Humicola insolens* (Carezyme®)

[0097] El procedimiento descrito anteriormente se realizó en péptidos derivados de una celulasa de *Humicola insolens* (Carezyme® de Novo Nordisk). Tal como se puede observar de la figura 13, se descubrieron 2 epítipos de células T, A01 y F06.

20

Ejemplo 4

Identificación de epítipos de células T en lipasa de *Thermomyces Lanuginosa* (Lipolase®)

- 25 [0098] El procedimiento descrito en el ejemplo 2 se realizó sobre péptidos derivados de una lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase® de Novo Nordisk). Tal como se puede observar a partir de la figura 14, se descubrieron dos epítipos de células T, A12 y C06. El péptido E03 produjo una proliferación de células T ligeramente incrementada en los donantes intactos, sin embargo, este péptido es consecutivo a A12 y representan un epítipo. En este aspecto, el experto en la materia entiende que la longitud de los epítipos puede variarse, y la potencia exacta del epítipo, natural o mutado, se puede determinar mediante los métodos de la presente invención.
- 30

Ejemplo 5

Identificación de epítipos de células T en endoglucanasa H de *Streptomyces plicatus*

35

[0099] El procedimiento descrito en el ejemplo 2 se realizó sobre péptidos derivados de endoglucanasa H de *Streptomyces plicatus*. Tal como se puede observar a partir de la figura 15, se descubrió un péptido único de células T, C06.

40 Ejemplo 6

Identificación de epítipos de células T en un híbrido de proteasas (GG36-BPN')

- 45 [0100] Después de determinar la localización de un epítipo de células T, se construyó un híbrido de proteasas utilizando técnicas de modificación de proteínas establecidas. El híbrido se construyó de manera que se sustituyó una secuencia de aminoácidos de la proteína altamente alergénica con una secuencia correspondiente de un homólogo menos alergénico. En este caso, los primeros 122 aminoácidos de la proteasa se derivaron de GG36 y la secuencia de aminoácidos restante derivaba de BPN'.

50 [0101] El híbrido se analizó primero de una muestra de 100 ppm de condición de norteamericana en un ensayo de 24 pocillos en muestras ("swatches") superfijadas a 0,5 ppm, líquido (Tide KT) a 0,5 en un ensayo de 24 pocillos con 3000 muestras ("swatches") y en el ensayo de N'-N-dimetil caseína, 5 g/l de DMC en detergente NA, método de detección de TNBS.

55 [0102] Los resultados se muestran en las figuras 16, 17 y 18.

Ejemplo 7Identificación de una proteína natural poco inmunogénica

- 5 [0103] Utilizando los métodos de la presente invención, se identificó la proteínasa K como productora de una respuesta inmunogénica inferior a otras proteasas comercialmente disponibles. La proteínasa K identificada en la presente invención es *Tritirachium Album limber*. Para una descripción general de proteasas y metodologías, véase, Mathew, C.G.P. Isolation of high molecular weight eukaryotic DNA, in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2: Nucleic Acids (Walker, J.M.,ed.), Humana, Clifton, NJ, (1984) pp. 31-34.

10

Ejemplo 8:Epítipo de células T introducido en una proteína no alergénica

- 15 [0104] Se ha observado que la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* es comparativamente no inmunogénica cuando se analiza en cobayas de de cepa Hartley. Una proteína relacionada de *Bacillus lentis* es altamente inmunogénica. Se definieron previamente los epítipos de células T funcionales en la molécula de *B. lentis* que no se hallaron en la molécula de *B. amyloliquefaciens*, aun cuando las secuencias de interés eran altamente homólogas. A efectos de analizar el principio de que la presencia de un epítipo de células T funcional puede controlar los niveles relativos de producción de anticuerpos, se creó un epítipo de células T de tipo *B. lentis* en la molécula de *B. amyloliquefaciens*. Este cambió se llevó a cabo mediante la sustitución de un único aminoácido en la secuencia de *B. amyloliquefaciens*. La subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y la variante modificada en el epítipo de células T de la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* se analizaron en un modelo de cobaya de inmunogenicidad.

- 25 [0105] Mapeo de epítipos de células T de subtilisina de *B. lentis* y *B. amyloliquefaciens*: las cobayas se inmunizaron con 20 µg/inmunización de subtilisina de *B. lentis* o *B. amyloliquefaciens*. Los animales se inmunizaron subcutáneamente en adyuvante cada dos semanas durante 10 a 12 semanas. Se creó una suspensión de células individuales de esplenocitos de cobaya a partir del bazo de cada animal. Las células se emplacaron a 5×10^5 esplenocitos por pocillo en placas de 96 pocillos de base redonda. Se sintetizaron mediante Mimotopes péptidos de 30 15 unidades desplazados en 3 aminoácidos. Los péptidos se resuspendieron hasta 1 mm en DMSO. Se añadieron los péptidos a las células a una concentración final de 5 µM. Los cultivos se incubaron durante 5 días a 37°C, CO₂ al 5%. Los pocillos se pulsaron con 0,5 µCi de timidina tritiada y se dejaron incubar durante 18 horas adicionales. Se recogieron los pocillos y se evaluó la incorporación de timidina.

- 35 [0106] Se hallaron dos epítipos de células T en subtilisina de *B. lentis*, y no se halló ninguno en subtilisina de *B. amyloliquefaciens* (>10 animales analizados para estos epítipos). Se observó que los epítipos de células T de *B. lentis* comprendían las siguientes secuencias:

IAALNNSIGVLGVAP (SEC ID NO:237) y LEWAGNNGMHVANLSLGS (SEC ID NO:238).

40

[0107] Para la SEC ID NO:237, la secuencia similar en subtilisina de *B. amyloliquefaciens* es VAALNNSIGVLGVAP (SEC ID NO:239). La región similar en la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* para SEC ID NO:238 fue la menos homóloga: IEWAIANNMDVINMSLG (SEC ID NO: 240).

- 45 [0108] La SEC ID NO:237 y la región homóloga en la molécula de subtilisina de *B. amyloliquefaciens* (SEC ID NO: 239) difieren en un aminoácido: en la subtilisina de *B. lentis* el primer aminoácido es una I, mientras que es una V en *B. amyloliquefaciens*. Por lo tanto, se razona que si se cambia la V en la secuencia de *B. amyloliquefaciens* por una I, se crearía el epítipo de células T de *B. Lentis* en la estructura de *B. amyloliquefaciens*.

- 50 [0109] Esta molécula se creó mediante técnicas estándar de biología molecular, y se denominó *B. amyloliquefaciens* V72I. También se conoció como GP002.

[0110] Inmunizaciones de cobaya: Se inmunizaron cobayas Hartley hembras adultas con varias dosis de subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y GP002. Las dosis fueron 1, 5, 10, y 20 µg/dosis. Hubo cuatro animales para cada dosis.

- 55 Los animales se inmunizaron subcutáneamente con enzima en Adyuvante Completo de Freund para la primera inmunización. Las posteriores inmunizaciones se realizaron en adyuvante Incompleto de Freund. Los animales se inmunizaron, y se tomó una muestra de suero, cada dos semanas.

- [0111] ELISA: Se realizó un ELISA directo. Las placas EIA Costart se recubrieron con 10 µg/ml de la enzima inmunizante en PBS durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron y se bloquearon con BSA al 1% en PBS. Las

muestras de suero se diluyeron en BSA/PBS al 1% y se incubaron en las placas recubiertas de enzimas durante 1 hora. Las muestras de suero se lavaron y se añadió IgG de cerdo anti-cobaya biotinilada a una dilución de 1:10.000 en BSA/PBS al 1%. El reactivo secundario se incubó durante 1 hora. Los pocillos se lavaron, y se añadió peroxidasa de rábano picante conjugada a avidina a los pocillos a una dilución de 1:000 en BSA/PBS al 1%. Después de 30 minutos, se añadió sustrato (ABTS) y se leyó la DO₄₀₅ después de 30 minutos.

[0112] Cálculo de títulos: Se restó la línea base de las lecturas de DO y los resultados se representaron para cada cobaya individual. Se realizó un análisis por regresión lineal en la parte lineal de la curva. El valor del título se calculó a partir de la ecuación de regresión lineal para una DO = 0,5. A continuación, se promediaron estos títulos individuales.

[0113] Dos cobayas en la dosis de 10 µg de GP001 murieron a las 2 semanas en el estudio. Por lo tanto, se desecharon los datos para la dosis de 10 µg.

[0114] Dos resultados son inmediatamente evidentes: primero, la variante GP002 aumentó los títulos de anticuerpo específico de antígeno sobre la evolución completa en el tiempo para las dosis más bajas de enzimas; y la variante GP002 aumentó los títulos de anticuerpo específico de antígeno para todas las dosis de enzimas en los puntos de tiempo más iniciales.

[0115] En puntos de tiempo extendidos y para dosis más elevadas, la diferencia entre subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y su variante ya no fue evidente. Véanse las figuras 19 y 20.

[0116] A partir de las figures, es evidente que un único cambio en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *B. Amyloliquefaciens* alteraba significativamente su inmunogenicidad.

Ejemplo 9

Reducción de alergenicidad in Vivo

[0117] Dada la posibilidad de identificar epítomos de células T humanas, es posible modificar su secuencia de aminoácidos para reducir la activación de células T y la posterior respuesta inmune a la proteína. Sin embargo, para evaluar el efecto in vivo de estos cambios, es necesario utilizar un modelo animal que representa la capacidad de moléculas HLA humana de presentar los epítomos. Por ejemplo, se han identificado epítomos de células T humanas en la molécula BPN' en las regiones 70-84 y 109-122 (véase USSN 09/500,135, solicitada el 8 de febrero, 2000; Figura 16).

[0118] Las sustituciones en la secuencia de aminoácidos de estos motivos condujeron a una proliferación reducida de células T in vitro utilizando células humanas que representan un amplio espectro de haplotipos de HLA humana. Los ensayos de unión in vitro utilizando líneas de células B transformadas con EBV demostraron que los péptidos 70-84 y 109-123 se unieron a moléculas HLA DQ2. Las sustituciones que se hallaron para reducir la proliferación de células T se introdujeron en la secuencia codificante para FNA (BPN' con una sustitución Y217L) para la producción de variantes FNA inmunogénicas reducidas.

[0119] Se utilizaron ratones transgénicos que expresaban genes de HLA humana para estudiar epítomos presentados al sistema inmune in vivo. Aunque las células inmunes de respuesta son de origen de ratón, existe una fuerte correlación entre los epítomos reconocidos en humanos y ratones. Sin embargo, un uso nuevo de los ratones transgénicos con HLA es el análisis de proteínas variantes para un potencial alérgico reducido como predicción de cómo responderán los individuos humanos.

[0120] Para demostrar este efecto, tanto FNA como la variante de FNA que contenían cambios de aminoácidos en los epítomos 70-84 y 109-123 se utilizaron para inmunizar ratones transgénicos con HLA DR3/DQ2 que se habían retrocruzado en ratones knockout I-Ab (que carecen de la expresión de moléculas endógenas I-A de clase II, referidas como C2D). Se inmunizaron ratones macho adultos HLA-DR3/DQ2/C2D con 50 µg de FNA o variante de FNA emulsionado en Adyuvante Completo de Freund. La inmunización se administró intraperitonealmente. Dos semanas más tarde, los ratones recibieron otra inmunización intraperitoneal de 50 µg de FNA o la variante emulsionado en Adyuvante Completo de Freund. Una semana más tarde, los ratones sangraron a través de la ruta retro-orbital y se recogió el suero. El suero se evaluó por los anticuerpos IgG específicos de antígeno en un protocolo ELISA directo. Brevemente, se recubrieron placas EIA de base plana de 96 pocillos durante la noche con 10 µg/ml de FNA desnaturalizado. Las placas se lavaron, se bloquearon con suero de ternera fetal al 1% y el suero se tituló en diluciones 1:10. El suero se extrajo lavando los pocillos, y se detectó la IG específica de antígeno con

IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante. Los resultados se presentan como la dilución en serie frente a la densidad óptica promedio (x 1000) en la Tabla 1 y la Figura 21.

Tabla 1

Dilución	FNA	Variante de FNA
10	2937,5	88
100	2476	120
1000	1695	103
10000	641,5	80
100000	207	85
1000000	129,5	76
10000000	88,5	85

5

[0121] Los resultados indicaban que los cambios introducidos en las regiones 70-84 y 109-123 reducían significativamente la capacidad de los ratones transgénicos DQ2 de producir una respuesta humoral a la variante y proporcionar un método para la caracterización in vivo de proteínas modificadas que predicho con los métodos de la presente invención mostraban una inmunogenicidad reducida en humanos.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar el potencial alergénico de una proteína modificada que comprende las etapas de,
- 5 a) inmunizar un primer ratón transgénico con una proteína de interés e inmunizar un segundo ratón transgénico con una proteína modificada, en el que dicha proteína modificada es una variante de dicha proteína de interés y dicha proteína de interés incluye un epítipo de células T en el que la variante difiere de la proteína de interés por tener un epítipo de células T alterado;
- b) recoger suero de dicho primer y dicho segundo ratón transgénico inmunizado;
- 10 c) medir el suero por las inmunoglobulinas específicas de antígeno;
- y
- d) comparar la respuesta inmunogénica de dicha variante y dicha proteína de interés; en el que el primer ratón transgénico y el segundo ratón transgénico son HLA DR3/DQ2, y en el que la variante y la proteína de interés producen una respuesta inmunogénica diferente en dichos ratones transgénicos.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha proteína de interés es una enzima.
3. El método según la reivindicación 2, en el que dicha enzima es una proteasa.
4. El método según la reivindicación 1, en el que la inmunoglobulina específica de antígeno es IgG.
- 20 5. El método según la reivindicación 1, en el que los ratones transgénicos HLA DR3/DQ2 se han retrocruzado con ratones que carecen de la expresión de moléculas endógenas I-A de clase II.
6. El método según la reivindicación 1, en el que dicho epítipo de células T se altera con sustituciones de
- 25 aminoácidos.
7. El método según la reivindicación 1, en el que dicho epítipo de células T se altera por tener una parte terminal de dicha proteína de interés que incluye dicho epítipo de células T sustituido por una parte terminal correspondiente de un homólogo de dicha proteína de interés, en el que dicho homólogo no comprende un epítipo de células T idéntico
- 30 a dicho epítipo de células T sustituido.
8. El método según la reivindicación 1, en el que dicha respuesta inmunogénica producida por la variante es inferior a la respuesta inmunogénica producida por la proteína de interés.
- 35 9. El método según la reivindicación 1, en el que dicha respuesta inmunogénica producida por la variante es mayor que la respuesta inmunogénica producida por la proteína de interés.
10. El método según la reivindicación 1, en el que dicha respuesta inmunogénica es predictiva de la respuesta
- 40 alérgica en humanos.
11. El método según la reivindicación 10, en el que dicha proteína de interés es una proteasa.

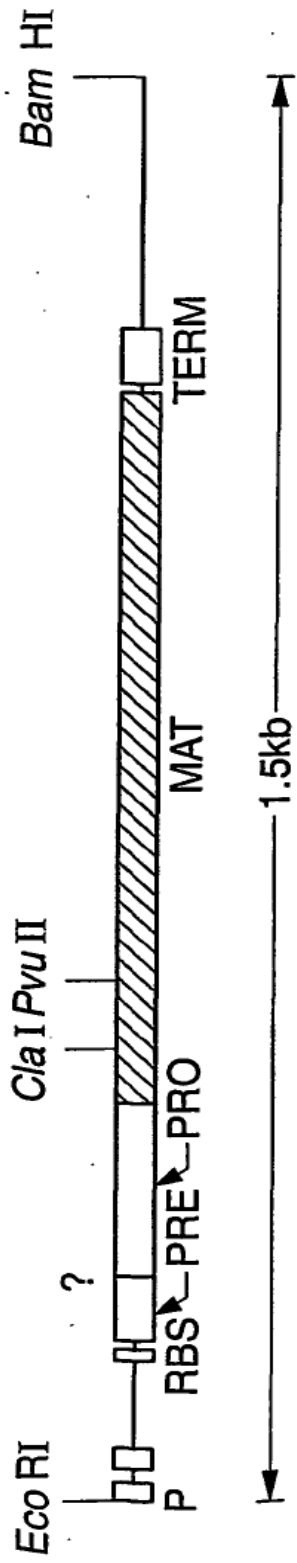


FIG. 1A

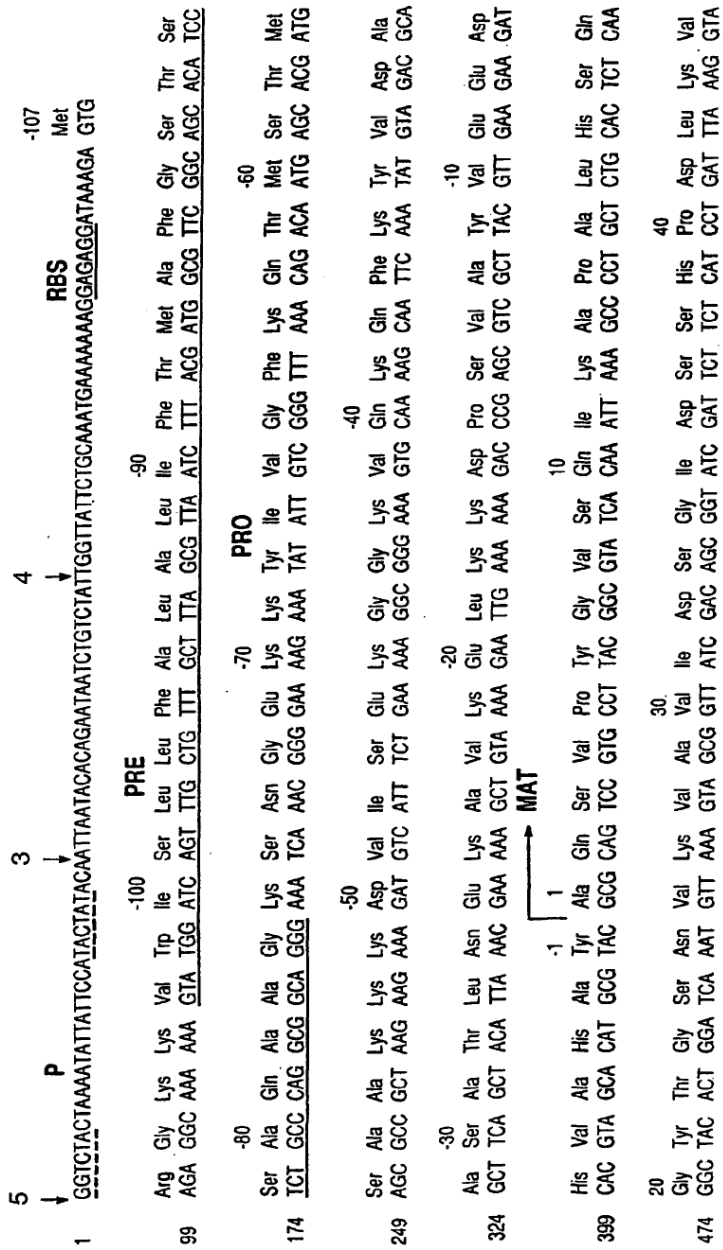


FIG. 1B - 1

50 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asp Asp His Gly Thr His Val Ala
 549 GCA GGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT CCT CCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT TCT CAC GGA ACT CAC GTT GGC
 60
 70 Thr Val Ala Ala Leu Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Ala 90 Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys
 624 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC GCT GTA AAA
 80
 110 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
 699 GTT CTC GGT GCT GAC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAG GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG
 120
 130 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
 774 GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA
 140
 150 Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly
 849 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT
 160
 170 Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro
 924 AAA TAC CCT TCT TCT ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT
 180
 200 Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
 999 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC AGC CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT
 210
 220 Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
 1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT
 230
 240

FIG.-1B - 2

1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TTC TAC TAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC
 Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn
 250 Gln 260

1224 GTA CAG GCG GCA GCT CAG TAA AACAIAAAAAACCGGCCCTGGCCCCGGGIIIIIIIIIIIICTCTCCGCGCATGTTCAATCCGCTCC
 Val Gln Ala Ala Ala Gln OC
 270
 TERM

1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTAACGAGAAACGGGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCAAGTCTGMAACGTCCTCAATCCGCGC

1416 CTCCCGGTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGGGGTTTTCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC

FIG._1B - 3

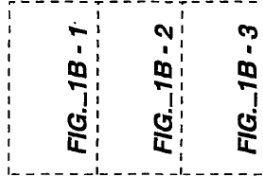


FIG._1B

RESIDUOS CONSERVADOS EN
SUBTILISINAS DE *BACILLUS*
AMYLOLIQUEFACIENS

1 10 20
 A Q S V P . G A P A . H . . G

 21 30 40
 . T G S . V K V A V . D . G H P

 41 50 60
 D L . . . G G A S . V P Q D

 61 70 80
 . N . H G T H V A G T . A A L N N S I G

 81 90 100
 V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G

 101 110 120
 S G . . S . L . . G . E W A . N

 121 130 140
 V . N . S L G . P S . S A . .

 141 150 160
 G V . V V A A . G N . G . . .

 161 170 180
 Y P . . Y A V G A .

 181 190 200
 D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A

 201 210 220
 P G V . . Q S T . P G . . Y N G T

 221 230 240
 S M A . P H V A G A A A L K . . .

 241 250 260
 W . . . Q . R . . L . N T . . . L G . .

 261 270
 . . Y G . G L . N . . A A . .

FIG._2

FIG._3A

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE SUBTILISINA DE:

B.amyloliquefaciens
B.subtilis
B.licheniformis
B.lentus

01	10	20	30	
AQSVPYGVSI	KAPALHSQGY	TGSSNVKVA	VIAV	DDSSHP
AQSVPYGII	KAPALHSQGY	TGSSNVKVA	VIAV	DDSSHP
AQTVPYGII	KADKVAQQGF	KGANVAVL	DDTGI	QASHHP
AQSVPWGII	SRVQA PA	AHNRGLTGS	GVAVL	DTGI
41	50	60	70	
DLKVAAGGAS	MPSEETNPF	QDDNNSHGT	HVAGT	VAAALNNSIG
DLNVRGGAS	FPSEETNPF	YQDDGSSHGT	HVAGT	VAAALNNSIG
DLNVVGGAS	FPVAGEAYN	*TDDGNHGT	HVAGT	VAAALNNTTG
DLNIRGGAS	FPVPGGE	*PSTQDDGNHGT	HVAGT	VAAALNNSIG
81	90	100	110	
VLGVAPSA	SLYAVKVL	LGADGSGQY	SWIINGI	EWAIANNMD
VLGVSPSA	SLYAVKVL	LDSTGSGQY	SWIINGI	EWAIANNMD
VLGVAPSA	VSLYAVKVL	LNSSGSGSY	SGIIVSGI	EWAITNCGMD
VLGVAPSA	EELYAVKVL	LGASGSGSV	SSIAQGL	EWAAGNCGMH
121	130	140	150	
VINMSLGGP	SGSAA	LKAAVD	KAVAS	GVVVA
VINMSLGGP	TGSTA	LKTVD	KAVSS	GVVVA
VINMSLGGP	AGSTAM	KQAVD	NAYAR	GVVVA
VANLSLGGP	SPSAT	LEQAV	NSAT	SRGV
				LVVA
				ASGN
				SGS
				AGS

161
 S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
 S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V N S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
 S T N T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S S N S N R R A S F S S V G A E L E V M A
 * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S S Q Y G A G L D I V A

201
 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
 P G V S I Q S T L P G G T Y G A Y N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P T
 P G A G V Y S T Y P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
 P G V N V Q S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L V K Q K N P S

241
 W T N T Q V R S S L E N T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
 W T N A Q V R R D R L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
 L S A S Q V R R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
 W S N V Q I R R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R

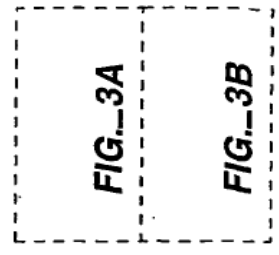


FIG._3B

FIG._3

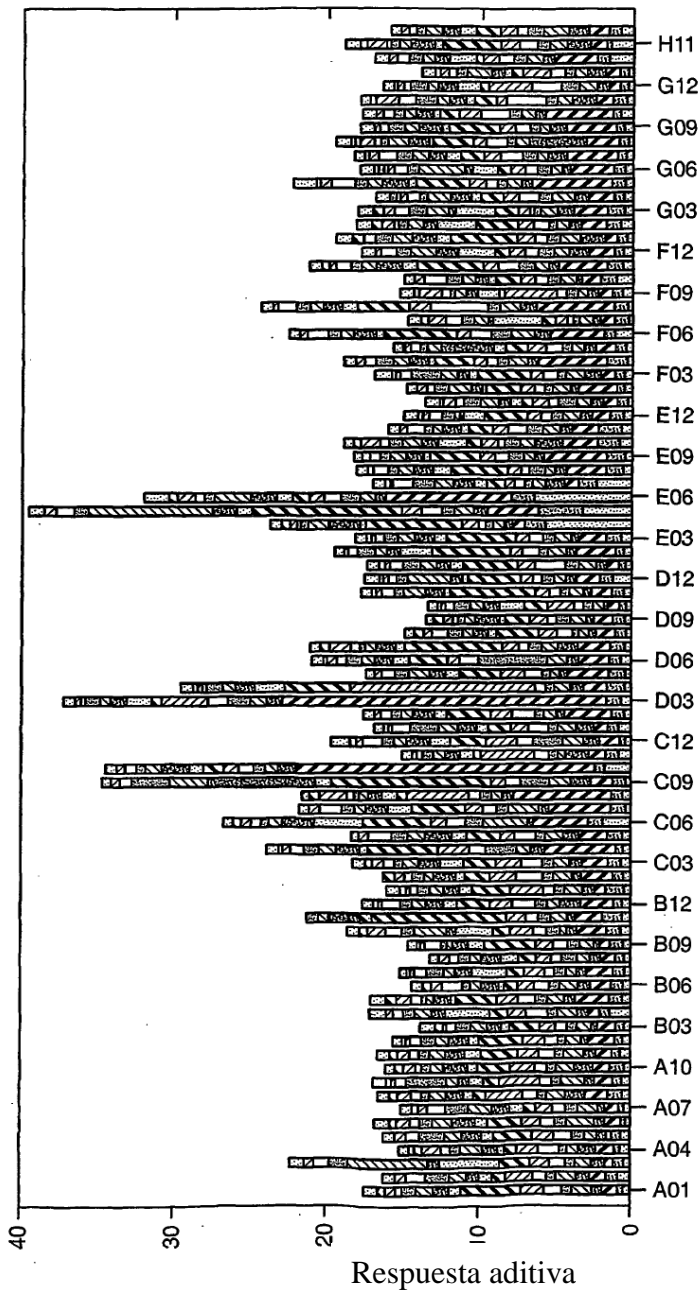


FIG.-4

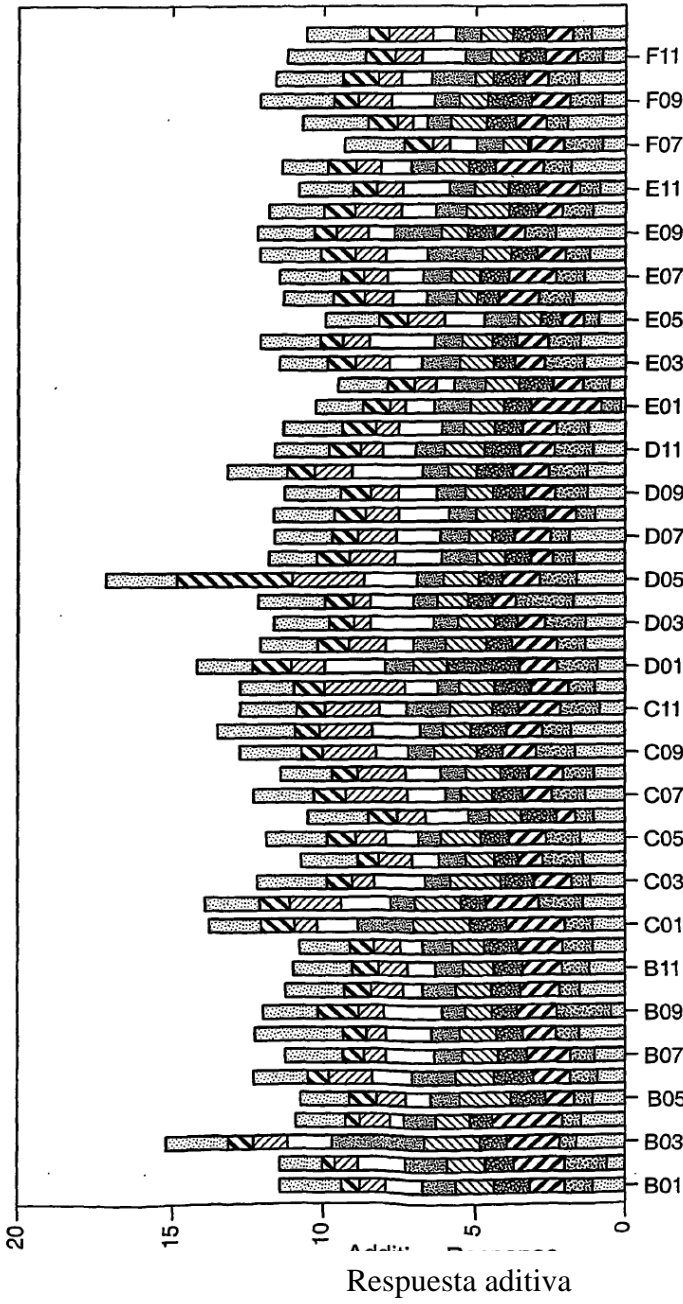


FIG.-5

1	A12	IKDFHVYFRESRDAG	49	E12	SATSRGVLVVAASGN
2	A11	LEQAVNSATSARGVLV	50	E11	SRGVLVVAASGNSGA
3	A10	AQSVPWGISRVQAPA	51	E10	VLVVAASGNSGAGSI
4	A9	VPWGISRVQAPAAHN	52	E9	VAASGNSGAGSISYP
5	A8	GISRVQAPAAHNRGL	53	E8	SGNSGAGSISYPARY
6	A7	RVQAPAAHNRGLTGS	54	E7	SGAGSISYPARYANA
7	A6	APAAHNRGLTGSQVK	55	E6	GSISYPARYANAMAV
8	A5	AHNRGLTGSQVKVAV	56	E5	SYPARYANAMAVGAT
9	A4	RGLTGSQVKVAVLDT	57	E4	ARYANAMAVGATDQN
10	A3	TGSQVKVAVLDTGIS	58	E3	ANAMAVGATDQNNNR
11	A2	GVKAVLDTGISTHP	59	E2	MAVGATDQNNNRASF
12	A1	VAVLDTGISTHPDLN	60	E1	GATDQNNNRASFQY
13	B12	LDTGISTHPDLNIRG	61	F12	DQNNNRASFQYGAG
14	B11	GISTHPDLNIRGGAS	62	F11	NNRASFQYGAGLDI
15	B10	THPDLNIRGGASFP	63	F10	ASFSQYGAGLDIVAP
16	B9	DLNIRGGASFPGEP	64	F9	SQYGAGLDIVAPGVN
17	B8	IRGGASFPGEPSTQ	65	F8	GAGLDIVAPGVNVQS
18	B7	GASFPGEPSTQDGN	66	F7	LDIVAPGVNVQSTYP
19	B6	FVPGEPSTQDGNHG	67	F6	VAPGVNVQSTYPGST
20	B5	GEPSTQDGNHGTHV	68	F5	GVNVQSTYPGSTYAS
21	B4	STQDGNHGTHVAGT	69	F4	VQSTYPGSTYASLNG
22	B3	DGNHGTHVAGTIAA	70	F3	TYPGSTYASLNGTSM
23	B2	GHGTHVAGTIAALNN	71	F2	GSTYASLNGTSMATP
24	B1	THVAGTIAALNNSIG	72	F1	YASLNGTSMATPHVA
25	C12	AGTIAALNNSIGVLG	73	G12	LNGTSMATPHVAGAA
26	C11	IAALNNSIGVLGVAP	74	G11	TSMATPHVAGAAALV
27	C10	LNNSIGVLGVAPSAE	75	G10	ATPHVAGAAALVKQK
28	C9	SIGVLGVAPSAELYA	76	G9	HVAGAAALVKQKNPS
29	C8	VLGVAPSAELYAVKV	77	G8	GAAALVKQKNPSWSN
30	C7	VAPSAELYAVKVLGA	78	G7	ALVKQKNPSWSNVQI
31	C6	SAELYAVKVLGASGS	79	G6	KQKNPSWSNVQIRNH
32	C5	LYAVKVLGASGSGSV	80	G5	NPSWSNVQIRNHLKN
33	C4	VKVLGASGSGSVSSI	81	G4	WSNVQIRNHLKNTAT
34	C3	LGASGSGSVSSIAQG	82	G3	VQIRNHLKNTATSLG
35	C2	SGSGSVSSIAQGLEW	83	G2	RNHLKNTATSLGSTN
36	C1	GSVSSIAQGLEWAGN	84	G1	LKNTATSLGSTNLYG
37	D12	SSIAQGLEWAGNNGM	85	H12	TATSLGSTNLYGSGL
38	D11	AQGLEWAGNNGMHVA	86	H11	SLGSTNLYGSGLVNA
39	D10	LEWAGNNGMHVANLS	87	H10	STNLYGSGLVNAEAA
40	D9	AGNNGMHVANLSLGS	88	H9	NLYGSGLVNAEAAATR
41	D8	NGMHVANLSLGSPPSP			
42	D7	HVANLSLGSPPSPSAT			
43	D6	NLSLGSPPSPSATLEQ			
44	D5	LGSPSPSATLEQAVN			
45	D4	PSPSATLEQAVNSAT			
46	D3	SATLEQAVNSATSRG			
47	D2	LEQAVNSATSRGVLV			
48	D1	AVNSATSRGVLVAA			

FIG. 6A

1	A12	IKDFHVYFRESRDAG	49	E12	KKIDVLNLSIGGPDF
2	A11	DAELHIFRVFTNNQV	50	E11	DVLNLSIGGPDFMDH
3	A10	PIRRASLSLGS GFWH	51	E10	NLSIGGPDFMDHFPV
4	A9	RASLSLGS GFWHATG	52	E9	IGGPDFMDHFPVDKV
5	A8	LSLGS GFWHATGRHS	53	E8	PDFMDHFPVDKVVWEL
6	A7	GSG FWHATGRHSSRR	54	E7	MDHFPVDKVVWELTAN
7	A6	FWHATGRHSSRLLLR	55	E6	PFVDKVVWELTANNVI
8	A5	ATGRHSSRLLRAIP	56	E5	DKVVWELTANNVIMVS
9	A4	RHSSRLLRAIPROV	57	E4	WELTANNVIMVSAIG
10	A3	SRLLRAIPROVAQT	58	E3	TANNVIMVSAIGNDG
11	A2	LLRAIPROVAQTLQA	59	E2	NVIMVSAIGNDGPLY
12	A1	AIPROVAQTLQADV L	60	E1	MVSAIGNDGPLYGTI
13	B12	RQVAQTLQADV LWQM	61	F12	AIGNDGPLYGTLNPN
14	B11	AQTLQADV LWQMGYT	62	F11	NDGPLYGTLNPNADQ
15	B10	LQADV LWQMGYTGAN	63	F10	PLYGTLNPNADQMDV
16	B9	DVLWQMGYTGANVRV	64	F9	GTLNPNADQMDVIGV
17	B8	WQMGYTGANVRVAVF	65	F8	NNPADQMDVIGVGGI
18	B7	GYTGANVRVAVFDTG	66	F7	ADQMDVIGVGGIDFE
19	B6	GANVRVAVFDTGLSE	67	F6	MDVIGVGGIDFEDNI
20	B5	VRVAVFDTGLSEKHP	68	F5	IGVGGIDFEDNIARF
21	B4	AVFDTGLSEKHPHFK	69	F4	GGIDFEDNIARFSSR
22	B3	DTGLSEKHPHFKNVK	70	F3	DFEDNIARFSSRGMT
23	B2	LSEKHPHFKNVKERT	71	F2	DNIARFSSRGMTTWE
24	B1	KHPHFKNVKERTNWT	72	F1	ARFSSRGMTTWELPG
25	C12	HFKNVKERTNWTNER	73	G12	SSRGMTTWELPGGYG
26	C11	NVKERTNWTNERTLD	74	G11	GMTTWELPGGYGRMK
27	C10	ERTNWTNERTLDDGL	75	G10	TWELPGGYGRMKPDI
28	C9	NWTNERTLDDGLGHG	76	G9	LPGGYGRMKPDIVTY
29	C8	NERTLDDGLGHGTFV	77	G8	GYGRMKPDIVTYGAG
30	C7	TLDDGLGHGTFVAGV	78	G7	RMKPDIVTYGAGVRG
31	C6	DGLGHGTFVAGVIAS	79	G6	PDIVTYGAGVRGSGV
32	C5	GHGTFVAGVIASMRE	80	G5	VTYGAGVRGSGVKGG
33	C4	TFVAGVIASMRECQG	81	G4	GAGVRGSGVKGGCRA
34	C3	AGVIASMRECQGFAP	82	G3	VRGSGVKGGCRALSG
35	C2	IASMRECQGFAPDAE	83	G2	SGVKGGCRALSGTSV
36	C1	MRECQGFAPDAELHI	84	G1	KGGCRALSGTSVASP
37	D12	CQGFAPDAELHIFRV	85	H12	CRALSGTSVASPVVA
38	D11	FAPDAELHIFRVFTN	86	H11	LSGTSVASPVVAGAV
39	D10	DAELHIFRVFTNNQV	87	H10	TSVASPVVAGAVTLL
40	D9	LHIFRVFTNNQVSYT	88	H9	ASPVVAGAVTLLVST
41	D8	FRVFTNNQVSYTSWF	89	H8	VVAGAVTLLVSTVQK
42	D7	FTNNQVSYTSWFLDA	90	H7	GAVTLLVSTVQKREL
43	D6	NQVSYTSWFLDAFNY	91	H6	TLLVSTVQKRELVNP
44	D5	SYTSWFLDAFNYAIL	92	H5	VSTVQKRELVNPASM
45	D4	SWFLDAFNYAILKKI	93	H4	VQKRELVNPASMKQA
46	D3	LDAFNYAILKKIDVL	94	H3	RELVNPASMKQALIA
47	D2	FNYAILKKIDVLNLS	95	H2	VNPASMKQALIASAR
48	D1	AILKKIDVLNLSIGG	96	H1	ASMKQALIASARRLP

FIG. 6B

97	I12	IKDFHVYFRESRDAG
98	I11	DAELHIFRVFTNNQV
99	I10	KQALIASARRLPGVN
100	I9	LIASARRLPGVNMFE
101	I8	SARRLPGVNMFEQGH
102	I7	RLPGVNMFEQGHGKL
103	I6	GVNMFEQGHGKLDLL
104	I5	MFEQGHGKLDLLRAY
105	I4	QGHGKLDLLRAYQIL
106	I3	GKLDLLRAYQILNSY
107	I2	DLLRAYQILNSYKPO
108	I1	RAYQILNSYKPOASL
109	J12	QILNSYKPOASLSPS
110	J11	NSYKPOASLSPSYID
111	J10	KPOASLSPSYIDLTE
112	J9	ASLSPSYIDLTECPY
113	J8	SPSYIDLTECPYMWP
114	J7	YIDLTECPYMWPYCS
115	J6	LTECPYMWPYCSQPI
116	J5	CPYMWPYCSQPIYYG

FIG. 6C

MKLVNIWLLLLLVLLCGKKHGLDRLEKKSFEKAPCGCSHLTLKVEFSSTVVEYEVIVAFNGYFT
 AKARNSFISALKSSVDNWR I I PRNNPSSDYPSDFEVIQIKEKQKAGLLTLEDHPNKRVTQR
 KVFRSLKYAESDPTVPCNETRWSQKWSSRPLRRASLSLGSGFWHATGRHSSRRLLR AI PRQVAQ
 TLQADVLRQMGYTGANVRVAVFDTGLSEKHPFKVKERTNWTNERTLDDGLGHGTFVAGVIASM
 RECQGFAPDAELHIFRVFTNNQVSYTSWFLDAFNAYAILKKIDVLNLSIGGPDFMDHPFVVKVWEL
 TANNVIMVSAIGNDPLYGTLNPNPADQMDVIGVGGIDFEDNIARFSSRGMPTWELPGGYGRMKPD
 IVTYGAGVRGSGVKGCCRALSGT SVASPVVAGAVTLLVSTVQKREL VNPASMKQALIASARRLPG
 VNMFEQGHGKLDLLRAYQI LNSYKPAQLSPSYIDLTECPYMWPYCSQPIIYGGMPTVNVVTILN
 GMGVTGRI VDKPDWQPYLPQNGDNIEVAFSYSSVLPWPSGYLAISI SVTKKAASWEGIAQGHVMI
 TVASPAETESKNGAEQTSVTKLPKVKI I PTPRSKRVLWDQYHNLRYPPGYFPRDNLRMKNDPL
 DWNGDHIHTNFRDMYQHLRSMGYFVEVLGAPFTCFDASQYGTLLMVDSEEEYFPEEIAKLRDVID
 NGLSLVIFSDWYNTSVMRKVKFYDENTRQWMPDTGGANI PALNELLSVWNMGFSDGLYEGETL
 ANHDMYYASGCSI AKFPEDGVVITQTFKDQGLEVLKQETA VENVPI LGLYQI PAEGGGRIVLYG
 DSNCLDSDHRQKDCFWLLDALLQYTSYGVTPPSSLHSGNRQRPFGAGSVTPERMEGNHLHRYSK
 VLEAHLGDPKPRPLPACPRLSWAKPQPLNETAPSNLWKHQKLLSIDLDKVVLPNFRSNRPQVRPL
 SPGESGAWDI PGGIMPGRYNOEVGQTI PVFAFLGAMVVLAFFVVQINKAKSRPKRRKPRVKRPQL
 MQQVHPKTPSV

FIG.- 7

FIG.-8

	10	20	30	40	50	
BPN'	AQSV	YPYGSQ	-IKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLK	-VAGGA	48	
SAVINASE	AQSV	PWGISR	-VQAPAAHNRGLTGSVKVAVLDTGI	-STHPDLN	-IRGGA	47
S2HSBT	-RAI	PRQVAQTLQADVLWQMGYTGANVRVAVFTDGLSEKHPFKNVKERT	49			
	60	70	80	90	100	
BPN'	SMVP	SETNPFQDNN	HGTHVAGTVAALNNSIGVLGVA	PSASLYAVKVLGA	98	
SAVINASE	SFVP	GPEPST	-QDGNHGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVA	PSAELYAVKVLGA	96	
S2HSBT	NW	-TNERTLDDGLGHGTFVAGVIA	SMRECQGF	--APDAELHIFRVFTN	94	
	110	120	130	140	150	
BPN'	DGSG	QYSWIINGIEWAIANNM	DVINMSLGGPS	-GSAALKAAVDKAVASGV	147	
SAVINASE	SGSG	SVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSL	GGPS	-PSATLEQAVNSATSRGV	145	
S2HSBT	NQV	SYTSWFLDAFN	YAILKKIDVLNLSIGGPDFMDH	PFVVKVWELTANNV	144	
	160	170	180	190	200	
BPN'	VVVA	AAGNEGTS	SGSSSTVGYPGKYP	PSVIAVGA	VDSNQRASFS	197
SAVINASE	LVVA	ASGNSGA	--GISYPARYANAMAVGATD	ONNRRASF	QYGAGL	191
S2HSBT	IMV	SAIGNDGP	--LYGTLN	NPADQMDVIGVGGID	PFEDN	192
	210	220	230	240	250	
BPN'	----	DVMA	PGVSIQSTLPGNKY	GAYNGTSMASPHVAGAAALIL	235	
SAVINASE	----	DIVA	PGVNVQSTYPG	STYASLNGTSMATPHVAGAAALVK	229	
S2HSBT	ELP	GGYGRMKP	DIVTYGAGV	RGSGVKGGCRALS	GTSVASPVVAGAVTLLV	242
	260	270	280	290		
BPN'	SKHP	NW	TNTQ	--VRS	LENTTKLGD	275
SAVINASE	QKNP	SWSNVQ	----IRNHL	KN	TATSLGSTNLYG	269
S2HSBT	STVQ	KREL	VNPASMKQALIASARR	LP	CGVNMFEQG	280
					----HGKL	

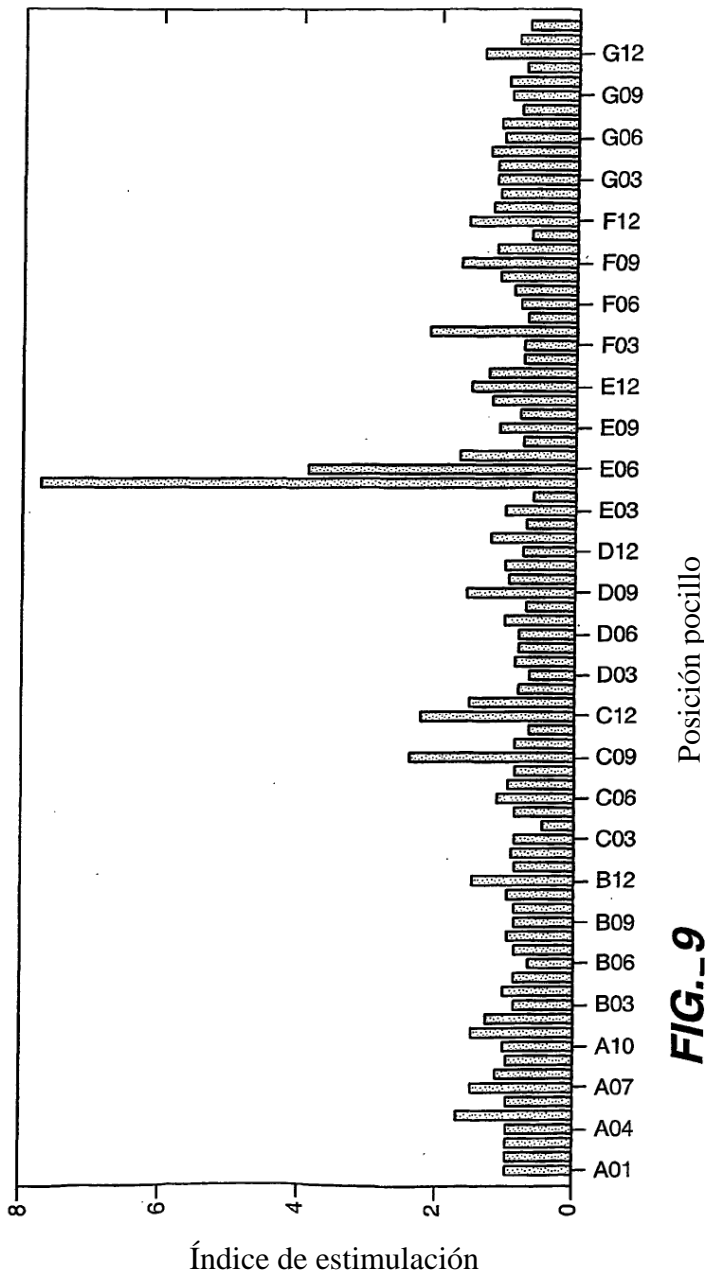


FIG._9

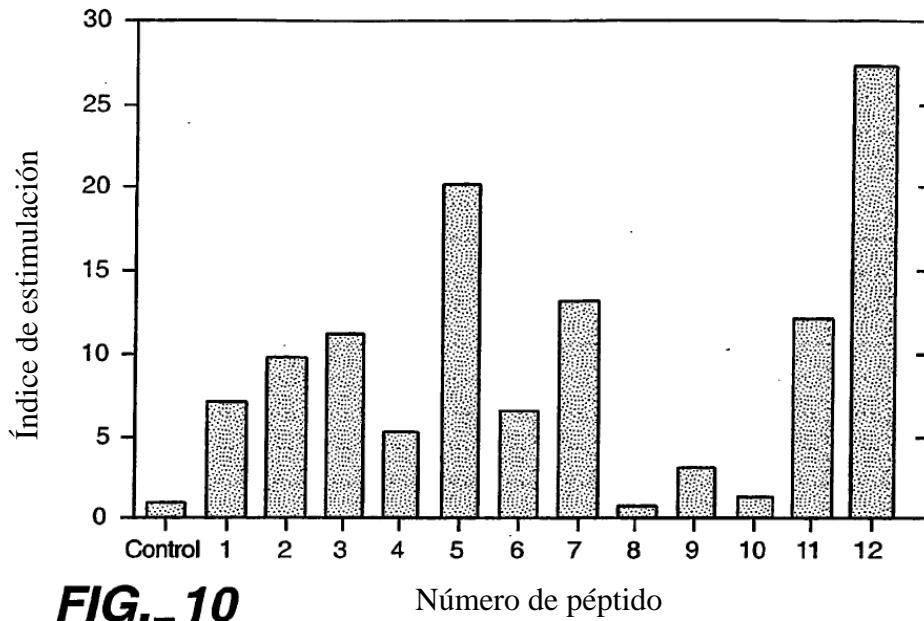


FIG. 10

NÚMERO DE PÉPTIDO	SECUENCIA
1 (Secuencia no modificada)	GSISYPARYANAMAV
2	ASISYPARYANAMAV
3	GAISYPARYANAMAV
4	GSASYPARYANAMAV
5	GSIAYPARYANAMAV
6	GSISAPARYANAMAV
7	GSISYAARYANAMAV
8	GSISYPAAYANAMAV
9	GSISYPARAANAMAV
10	GSISYPARYAAAMAV
11	GSISYPARYANAAAV
12	GSISYPARYANAMAA

FIG. 11

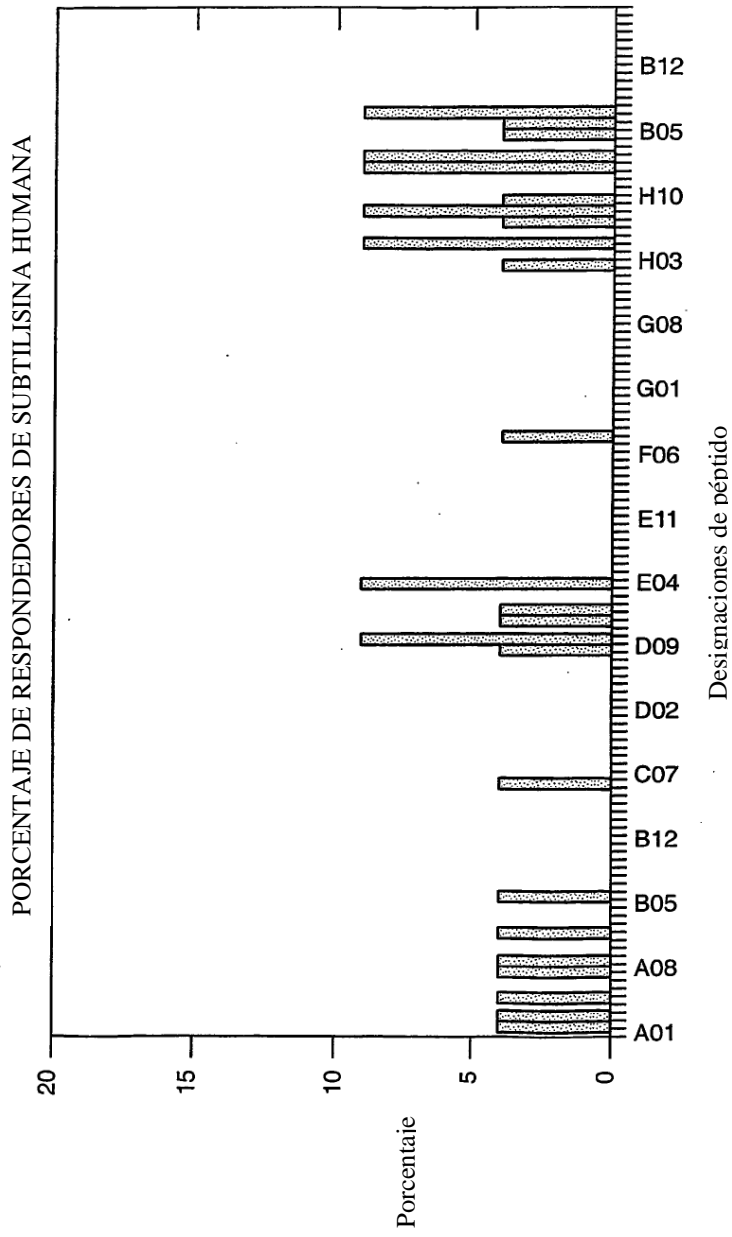


FIG.-12

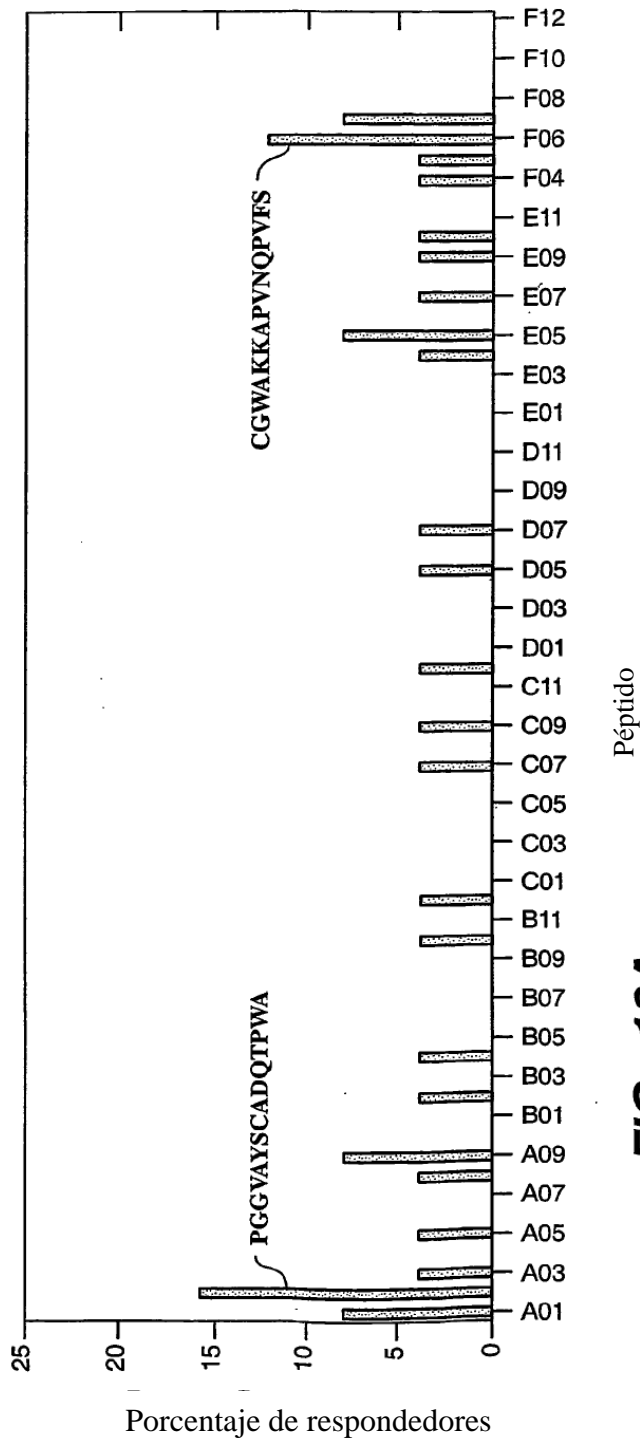


FIG. 13A

1	2	3	4	5
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
MRSSPLLPSA	VVAALPVLAL	AADGRSTRYW	DCCKPSCGWA	<u>KKAPVNQPVF</u>
<u>SCNANFQRIT</u>	<u>DFDAKSGCEP</u>	<u>GGVAYSCADQ</u>	<u>TPWAVNDDFA</u>	LGFAATSIAG
SNEAGWCCAC	YELTFTSGPV	AGKKMVVQST	STGGDLGSNH	FDLNIPGGGV
GIFDGCTPQF	GGLPGQRYGG	ISSRNECDRF	PDALKPGCYW	RFDWFKNADN
PSFSFRQVQC	PAELVARTGC	RRNDDGNFPA	VQIPSSSTSS	PVNQPTSTST
TSTSTTSSPP	VQPTTPSGCT	AERWAQ		

FIG._ 13B

1 mrsslvlffv sawtalaspi rrevsqdlfn qfnlfaqysa aaycgknnda
 51 pagtnitctg nacpevekad atflysfeds gvqdvqqla ldntnklivl
 101 sfrgrsrien wignlnfdlk eindicsgcr ghdgftsswr svadtlrqkv
 151 edavrehpdy rvvftghslg galatvagad lrgngydidv fsygaprvgn
 201 rafaefltvq tggtyrith tndivprlpp refgyshssp eywiksgtlv
 251 pvtrndivki egidatggnn qpnipdipah lwyfgligtc l

FIG._ 14B

1 mftpvrrrvr taalalsaaa alvlgstaas gasatpspap apapapvkqg
 51 ptsvayvevn nnsmlnvgyky tladgggnaf dvavifaani nydtgktay
 101 lhfneenvqrv ldnnavtqirp lqqqgikvll svlqnhqqag fanfpsqqaa
 151 safakqlsda vakyglgdvd fddeyaeygn ngtaqpndss fvhlvtalra
 201 nmpdkiisly nigpaasrls yggvdvsdkf dyawnpyygt wqvpqialpk
 251 aqlspaavei grtsrstvad larrtvdegy gvyltynldg gdrtadv saf
 301 trelygseav rtp

FIG._ 15B

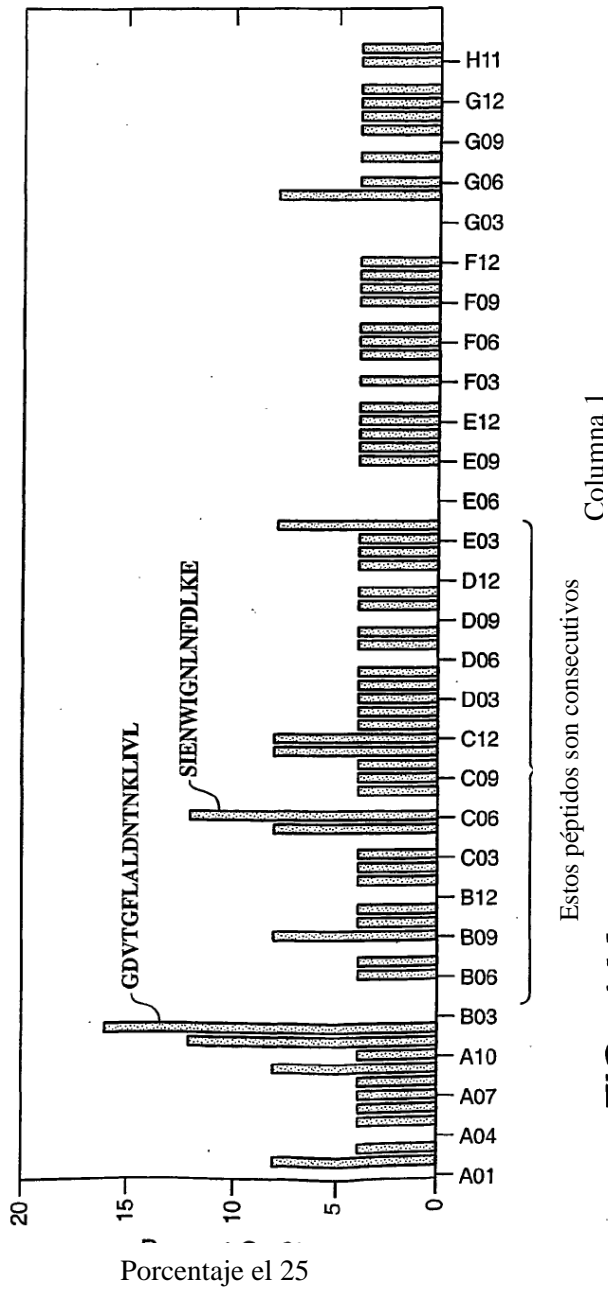


FIG. 14A

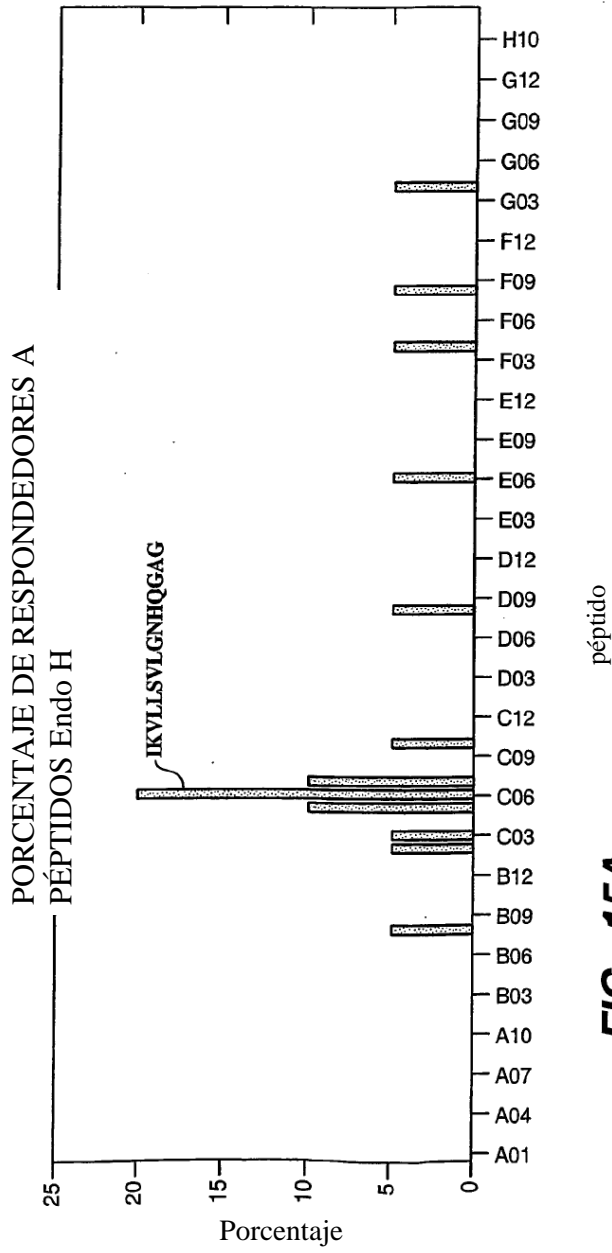


FIG.- 15A

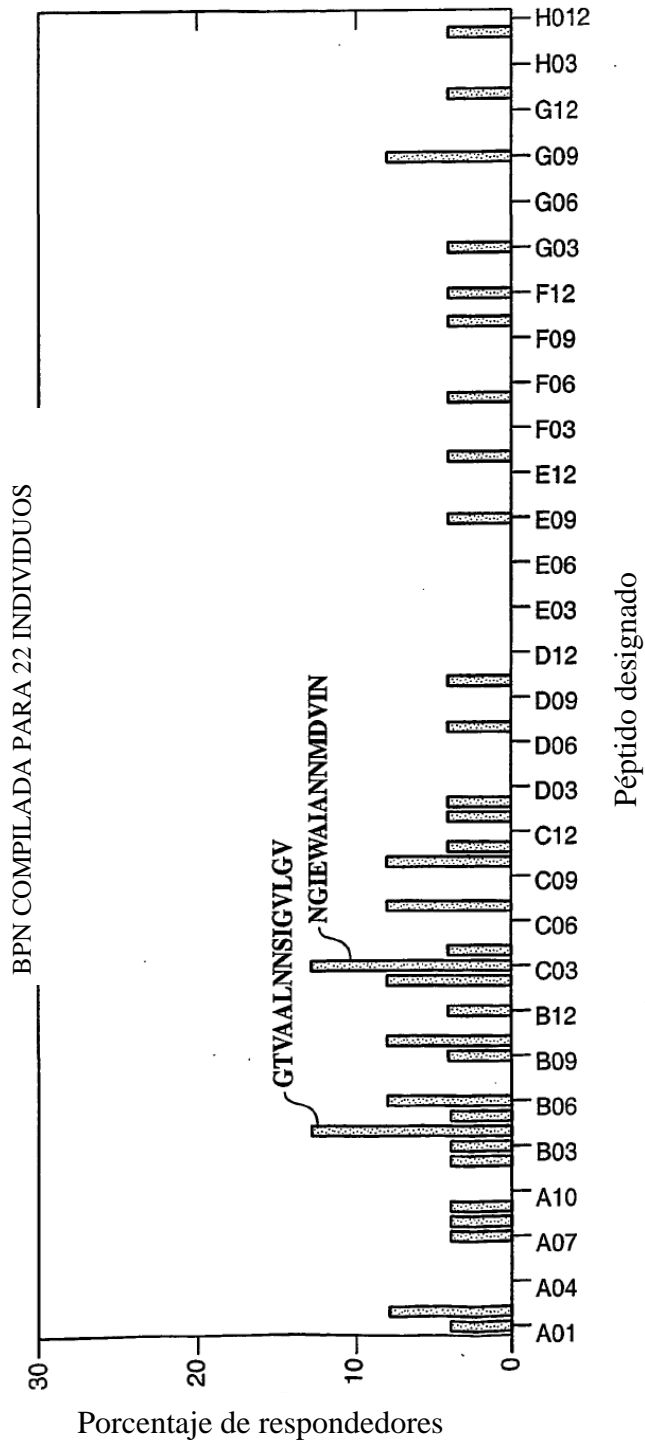


FIG. 16

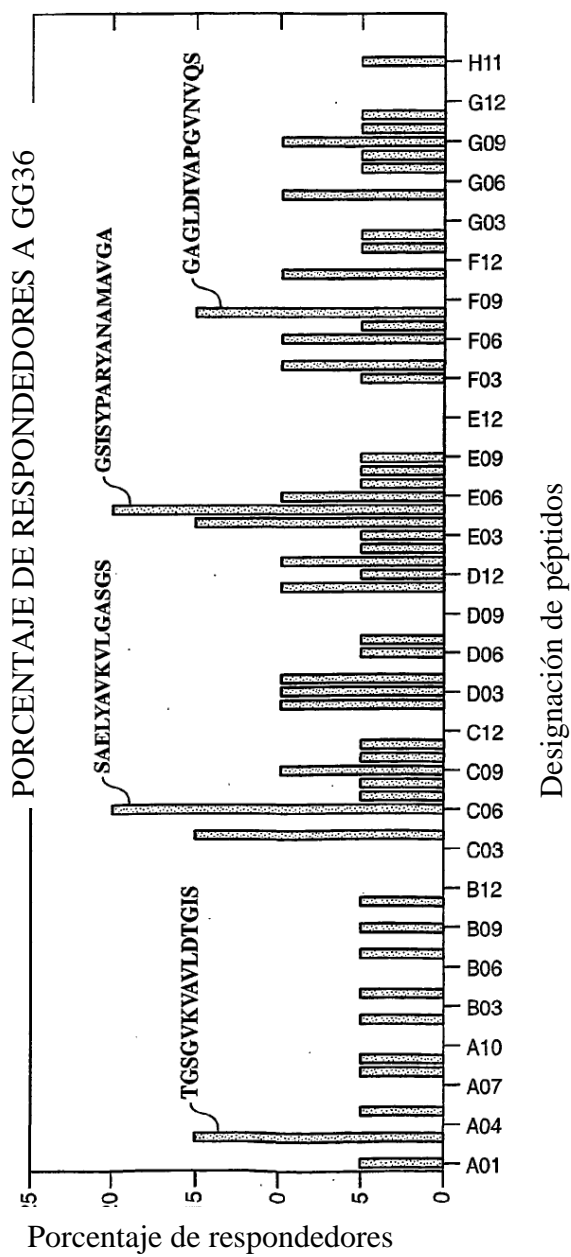


FIG.-17

Secuencia de enzima híbrida (GG36-BPN)

GG36
AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHG

BPN

GTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVINMSLGGG
Δ

GSAALKAAVDKAVASGVVVVAAGNEGTSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRAFSSVGP

ELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALLSKHPNWTNTQVRSSLENTTKLGD

SFY Y GKGLINVQAAQ

FIG.- 18

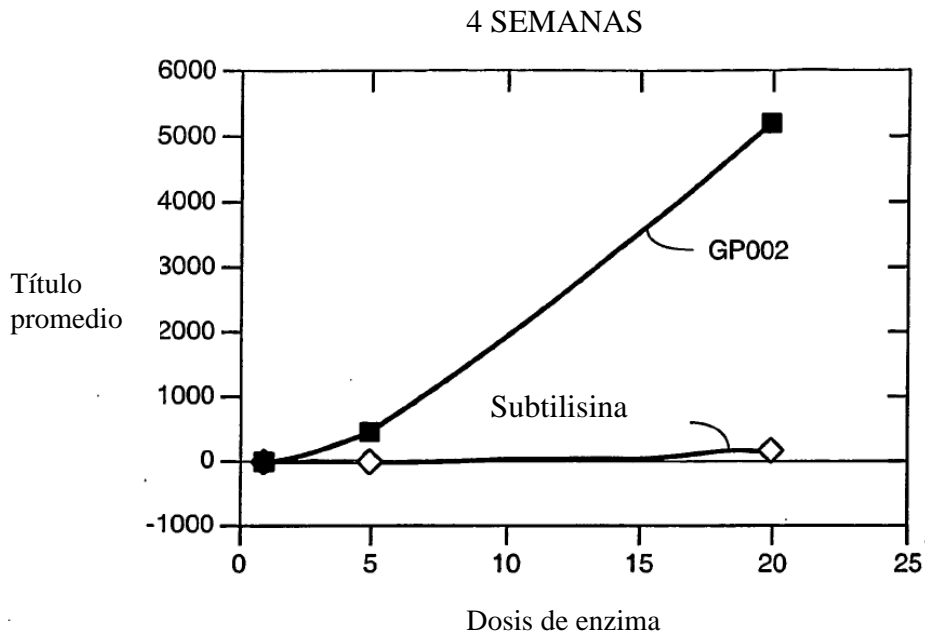


FIG._19A

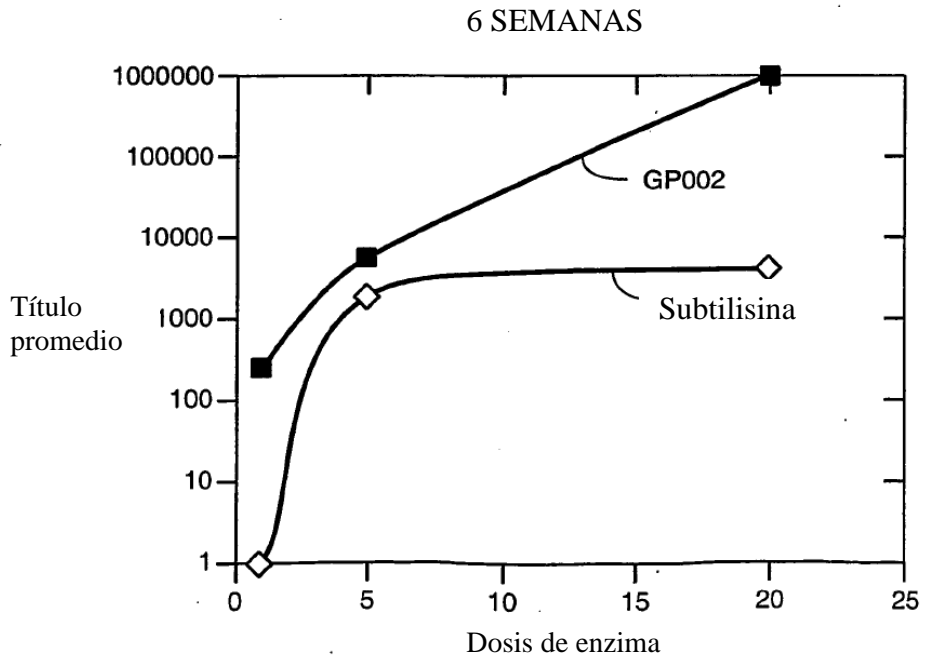


FIG._19B

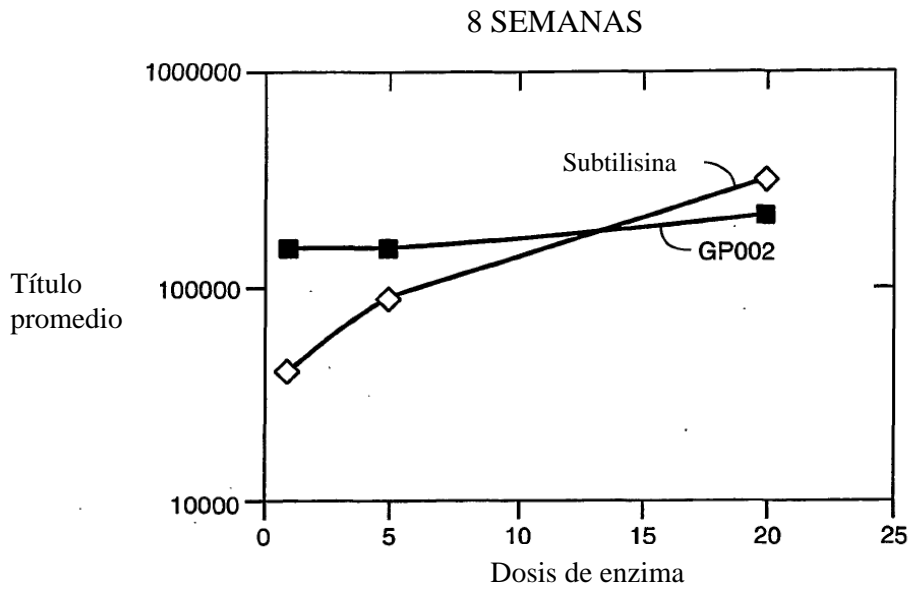


FIG. 19C

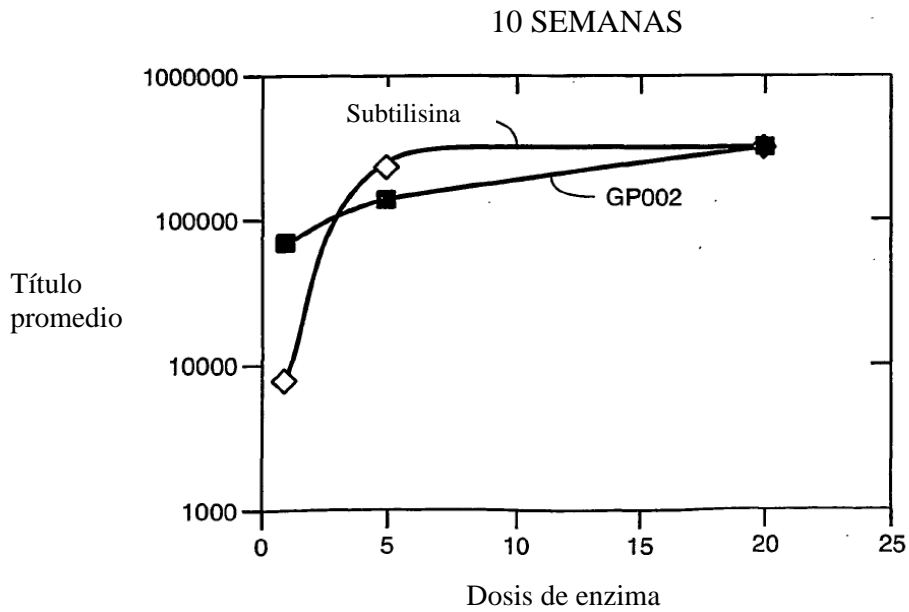


FIG. 19D

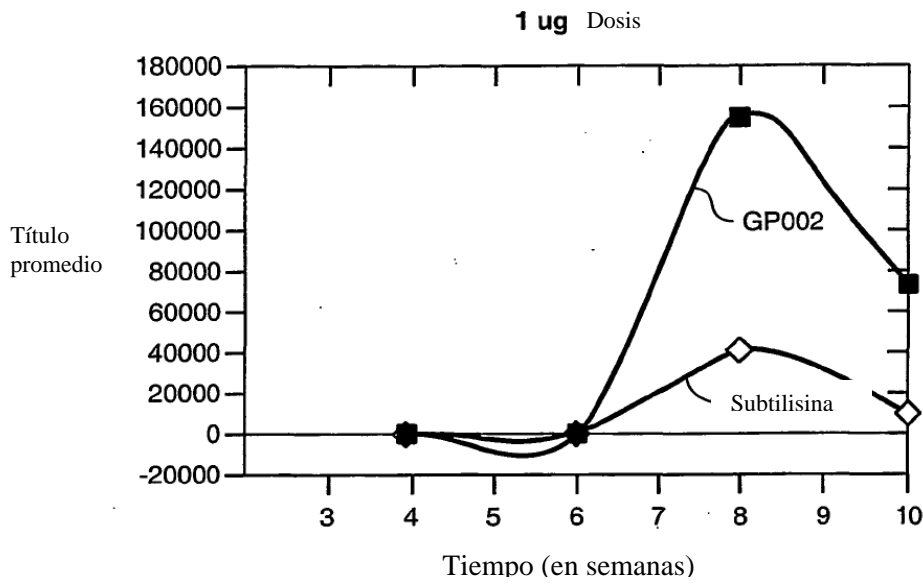


FIG. 20A

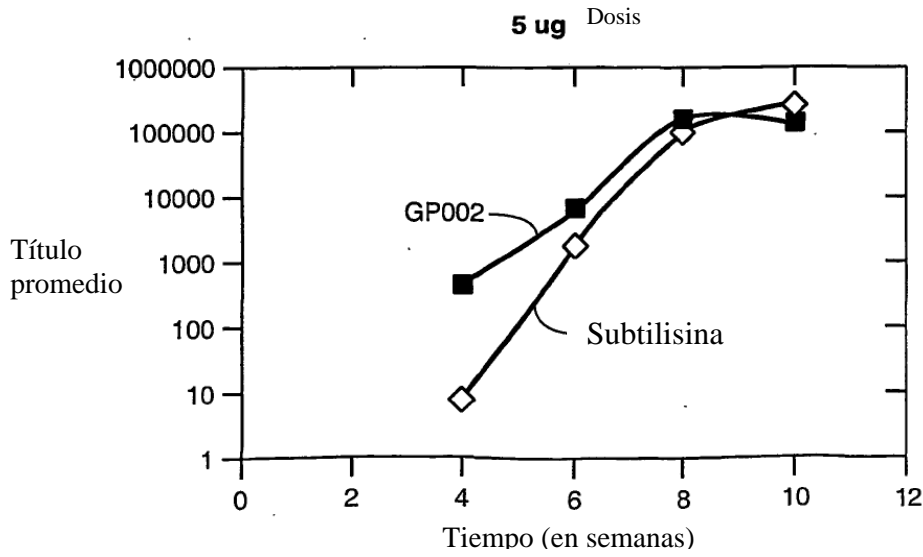


FIG. 20B

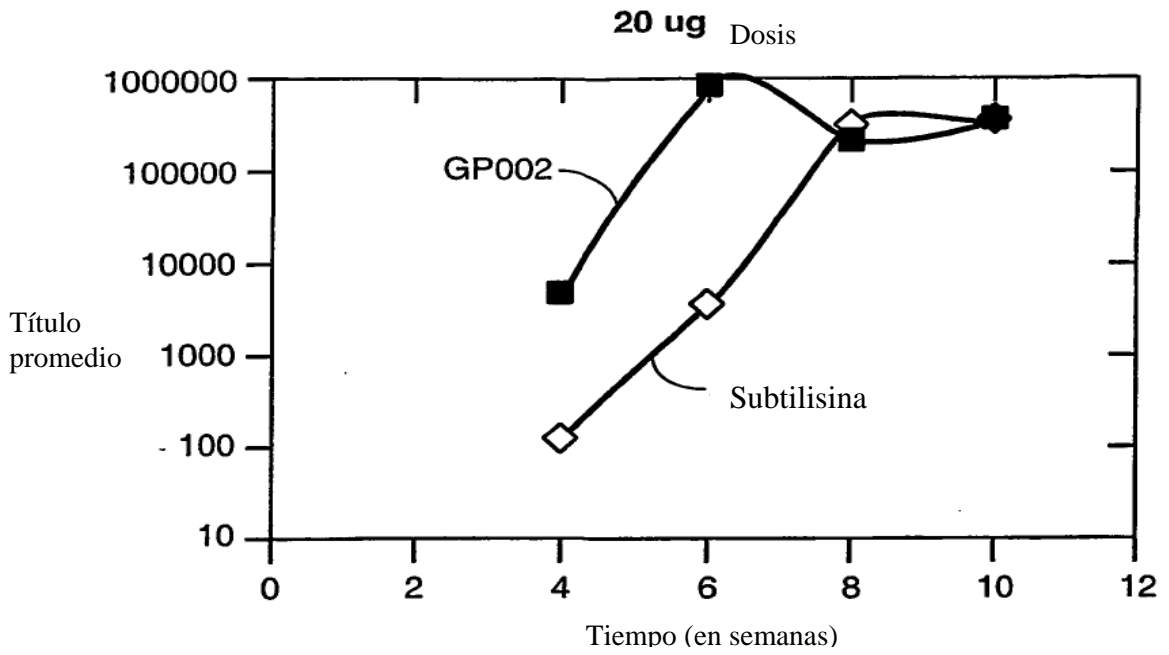


FIG. 20C

Respuestas a Anticuerpos IgG policlonal HLADR3/DQ2 a FNA y variante de FNA

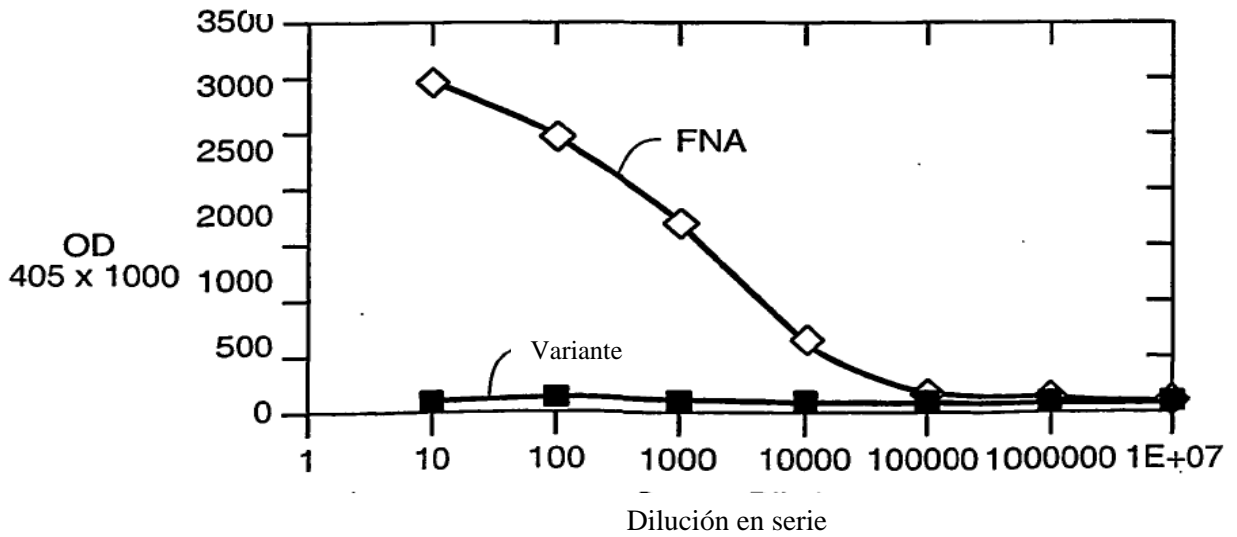


FIG. 21