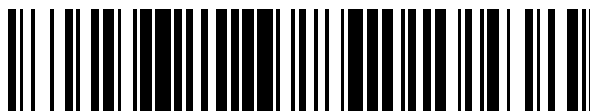


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 099**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2002 E 02718142 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1361893**

54 Título: **Anticuerpos anti-EGFR modificados con inmunogenicidad reducida**

30 Prioridad:

19.02.2001 EP 01103954

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

13.03.2013

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**CARR, FRANCIS, J.;
CARTER, GRAHAM;
JONES, TIM;
WILLIAMS, STEPHEN y
HAMILTON, ANITA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 398 099 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

Anticuerpos anti-EGFR modificados con inmunogenicidad reducida

ÁMBITO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a la modificación del anticuerpo anti-EGFR 425 en sus distintas formas y fragmentos del mismo para obtener variantes AcM 425 que sean sustancialmente no inmunogénicas o menos inmunogénicas que cualquier homólogo no modificado cuando se usan *in vivo*, y a los métodos de fabricación de este anticuerpo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (receptor de EGF o EGFR, por sus siglas en inglés), también conocido como *c-erbB1/Her1*, y el producto del oncogén *neu* (también conocido como *c-erbB2/Her 2*) son los miembros de la superfamilia de receptores de EGF, la cual pertenece a la gran familia de receptores tirosina quinasa. Interaccionan en la superficie celular con factores de crecimiento específicos o ligandos naturales, tales como EGF o TGF alfa y, de este modo, activan el receptor tirosina quinasa. Se activa una cascada de proteínas de señalización anterógradas en general produciendo una expresión génica alterada y tasas de crecimiento aumentadas.

15 C-erbB2 (Her 2) es una tirosina quinasa transmembrana que tiene un peso molecular de aproximadamente 185.000 con una homología considerable al receptor de EGF (Her 1), aunque hasta el momento todavía no se ha identificado claramente un ligando específico para Her 2.

20 El receptor de EGF es una glicoproteína transmembrana que tiene un peso molecular de 170.000 y se encuentra en muchos tipos de células epiteliales. Se activa al menos mediante tres ligandos, EGF, TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa) y anfirregulina. Se ha demostrado que tanto el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) se unen al receptor de EGF e inducen la proliferación celular y el crecimiento tumoral. Estos factores de crecimiento no se unen a Her2 (Ulrich y Schlesinger, 1990, *Cell* 61, 203). Al contrario que varias familias de factores de crecimiento, que inducen la dimerización del receptor en virtud de su naturaleza dimérica (p. ej., PDGF), los factores de crecimiento monomérico, como el EGF, contienen dos sitios de unión para sus receptores y, por tanto, pueden entrecruzar dos receptores de EGF vecinos (Lemmon y col., 1997, *EMBO J.* 16, 281). La dimerización del receptor es esencial para la estimulación de la actividad catalítica intrínseca y para la autofosforilación de los receptores de factores de crecimiento. Debe destacarse que los receptores proteína tirosina quinasa (PTK) son capaces de sufrir tanto homo como heterodimerización.

30 Estudios clínicos indican que tanto el receptor de EGF como el c-erbB2 se sobreexpresan en determinados tipos de tumores, en especial cánceres de mama, ovario, vejiga, colon, riñón, cabeza y cuello y carcinomas escamosos de pulmón (Mendelsohn, 1989, *Cancer Cells* 7, 359; Mendelsohn, 1990, *Cancer Biology* 1, 339). Por tanto, estas observaciones han estimulado investigaciones preclínicas cuyo objetivo es inhibir la función de los receptores de EGF o los c-erbB2 humanos como técnicas terapéuticas novedosas para tratar el cáncer (véase, p. ej., Baselga y col., 1996, *J. Clin. Oncol.* 14, 737; Fan y Mendelsohn, 1998, *Curr. Opin. Oncol.* 10, 67). Se ha descrito que, por ejemplo, anticuerpos anti-EGF, así como anticuerpos anti-Her 2 muestran resultados provechosos en la terapia contra el cáncer en humanos. Por lo que el anticuerpo monoclonal humanizado 4D5 (AcMh 4D5, HERCEPTIN[®]) ya es un producto comercializado.

40 Se ha demostrado que los anticuerpos anti-receptor EGF al tiempo que bloquean la unión de EGF y TGF- α al receptor pueden inhibir la proliferación de las células tumorales. A la vista de estos resultados, se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales murinos y de rata frente al receptor de EGF en los que se ha comprobado su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo* (Modjtahedi y Dean, 1994, *J. Oncology* 4, 277).

45 El anticuerpo monoclonal humanizado 425 (AcMh 425, documentos US 5.558.864 y EP 0531 472) y el anticuerpo monoclonal quimérico 225 (AcMc 225) (Naramura y col., 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 37, 343-349, documento WO 96/40210), dirigidos ambos frente al receptor de EGF, han mostrado su eficacia en ensayos clínicos.

50 Se demostró que el anticuerpo C225 inhibía el crecimiento *in vitro* de células tumorales mediado por EGF e inhibía la formación de tumores humanos *in vivo* en ratones lampiños. Además, parece que el anticuerpo actúa, sobre todo, en sinergia con determinados agentes quimioterapéuticos (es decir, doxorubicina, adriamicina, taxol y cisplatino) para erradicar tumores humanos *in vivo* en modelos de xenotrasplante en ratones. Ye y col. (1999, *Oncogene* 18, 731) han publicado que las células de cáncer de ovario humano pueden tratarse de forma eficaz con una combinación de AcMc 225 y AcMh 4D5.

Existen muchos casos en los que la eficacia de una proteína terapéutica está limitada por una reacción inmunitaria no deseada a dicha proteína terapéutica. Diversos anticuerpos monoclonales de ratón han mostrado ser prometedores como tratamientos en varios contextos patológicos humanos, pero en ciertos casos han fracasado debido a la inducción de grados significativos de respuesta de anticuerpos anti-murinos humanos (HAMA, por sus siglas en inglés) [Schroff, R. W. y col. (1985) *Cancer Res.* **45**: 879-885; Shawler, D. L. y col. (1985) *J. Immunol.* **135**: 1530-1535]. Para anticuerpos monoclonales, se han desarrollado varias técnicas para intentar reducir la respuesta HAMA [documentos WO 89/09622; EP 0239400; EP 0438310; WO 91/06667]. Estas técnicas de ADN recombinante generalmente han reducido la información genética del ratón en la construcción final del anticuerpo al tiempo que se aumentaba la información genética humana en dicha construcción final. No obstante, en varios casos, los anticuerpos «humanizados» resultantes han seguido desarrollando una respuesta inmune en pacientes [Issacs J. D. (1990) *Sem. Immunol.* **2**: 449-456; Rebello, P. R. y col. (1999) *Transplantation* **68**: 1417-1420].

Los anticuerpos no son la única clase de molécula polipeptídica administrada como agente terapéutico frente a la cual puede desarrollarse una respuesta inmunitaria. Incluso proteínas de origen humano y con las mismas secuencias de aminoácidos que las que aparecen en humanos pueden inducir una respuesta inmunitaria en humanos. Entre los ejemplos destacables se incluye el uso terapéutico del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos [Wadhwa, M. y col. (1999) *Clin. Cancer Res.* **5**: 1353-1361] e interferón alfa 2 [Russo, D. y col. (1996) *Bri. J. Haem.* **94**: 300-305; Stein, R. y col. (1988) *New Engl. J. Med.* **318**: 1409-1413] entre otros.

Un factor clave en la inducción de una respuesta inmunitaria es la presencia en la proteína de péptidos que puedan estimular la actividad de las células T mediante su presentación en el contexto de las moléculas de MHC de clase II, los denominados «epítopes de células T». Estos epítopes potenciales de células T se definen normalmente como cualquier secuencia de restos de aminoácidos con capacidad para unirse a moléculas de MHC de clase II. Estos epítopes de células T pueden calcularse para que establezcan unión a MHC. De forma implícita, por «epítotope de células T» se entiende un epítotope que cuando se une a moléculas de MHC puede ser reconocido por un receptor de la célula T (TCR) y el cual puede, al menos en principio, causar la activación de estas células T acoplándose a un TCR para inducir una respuesta de células T. Sin embargo, normalmente se entiende que estos determinados péptidos que se han encontrado unidos a moléculas de MHC de clase II pueden retenerse en una secuencia proteica porque el organismo en el que se administra la proteína final los reconoce como «propios».

Se sabe que algunos de estos péptidos de epítopes de células T pueden liberarse durante la degradación de péptidos, polipéptidos o proteínas dentro de las células y posteriormente son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) para desencadenar la activación de células T. Para péptidos presentados por MHC de clase II, esta activación de células T puede entonces dar lugar, por ejemplo, a una respuesta de anticuerpos mediante estimulación directa de células B para producir tales anticuerpos.

Las moléculas de MHC de clase II son un grupo de proteínas muy polimórficas que tienen una función central en la selección y activación de células T colaboradoras. El grupo DR de antígenos leucocitarios humanos (HLA-DR, por sus siglas en inglés) son el isotipo predominante de este grupo de proteínas y son el principal foco de atención de la presente invención. Sin embargo, los isotipos HLA-DQ y HLA-DP efectúan funciones similares, por consiguiente, la presente invención es igualmente aplicable a estos. La molécula DR de MHC de clase II está constituida por una cadena alfa y una beta que se insertan en sus C terminales a través de la membrana celular. Cada heterodímero posee un dominio de unión a ligando que se une a péptidos de entre 9 y 20 aminoácidos de longitud, aunque el surco de unión pueda acomodar un máximo de 11 aminoácidos. El dominio de unión a ligando consta de los aminoácidos del 1 al 85 de la cadena alfa y de los aminoácidos del 1 al 94 de la cadena beta. Recientemente se ha demostrado que las moléculas DQ presentan una estructura homóloga y también se supone que las proteínas de la familia DP son muy similares. En humanos, se conocen aproximadamente 70 alotipos distintos del isotipo DR, existen 30 alotipos distintos para DQ y se conocen 47 alotipos diferentes para DP. Cada individuo presenta de dos a cuatro alelos DR, dos alelos DQ y dos DP. Se ha resuelto la estructura de varias moléculas DR y tales estructuras indican un surco de unión a péptidos de extremo abierto con varios bolsillos hidrófobos que acoplan restos hidrófobos (restos del bolsillo) del péptido [Brown y col. *Nature* (1993) **364**: Stern y col. (1994) *Nature* **368**: 215]. El polimorfismo que identifica los diferentes alotipos de la molécula de clase II contribuye a una amplia diversidad de diferentes superficies de unión para péptidos dentro del surco de unión a péptidos y a nivel poblacional asegura una flexibilidad máxima con respecto a la capacidad para reconocer proteínas extrañas y organizar una respuesta inmunitaria frente a organismos patógenos.

Esto representa una cantidad considerable de polimorfismo dentro del dominio de unión a ligando con distintas «familias» dentro de diferentes poblaciones geográficas y grupos étnicos. Este polimorfismo afecta a las características de unión del dominio de unión a péptido, por consiguiente, diferentes «familias» de moléculas DR tendrán especificidades para péptidos con diferentes propiedades de secuencia, aunque puede que exista solapamiento. Esta especificidad determina el reconocimiento de epítopes de células Th (respuesta a células T de clase II), los cuales son, en última instancia, responsables de conducir la respuesta de anticuerpos frente a epítopes de células B presentes en la misma proteína de la cual derivan los epítopes de células Th. Por consiguiente, la respuesta inmunitaria frente a una proteína en un individuo se ve muy influenciada por el reconocimiento del epítotope

de células T, el cual es una función de la especificidad de unión a péptidos de ese alotipo HLA-DR del individuo. Por tanto, para identificar epítopes de células T dentro de una proteína o péptido en el contexto de una población global, es conveniente considerar las propiedades de unión como un conjunto tan variado como sea posible de alotipos HLA-DR, cubriendo de este modo el porcentaje más elevado posible de la población mundial.

5 Una respuesta inmunitaria frente a una proteína terapéutica como la proteína objeto de esta invención, se desarrolla a través de la ruta de presentación del péptido de MHC de clase II. Aquí, las proteínas exógenas son engullidas y procesadas para su presentación en asociación con moléculas de MHC de clase II del tipo DR, DQ o DP. Las moléculas de MHC de clase II se expresan en células presentadoras de antígenos (APC) profesionales, como macrófagos y células dendríticas entre otras. El reconocimiento de un complejo MHC de clase II- péptido por un
10 receptor de célula T relacionado en la superficie de la célula T, junto con la unión cruzada de determinados correceptores diferentes, como la molécula CD4, puede inducir un estado activado dentro de la célula T. La activación induce la liberación de citocinas que adicionalmente activan a otros linfocitos, como las células B que producen anticuerpos o activación de células T citotóxicas como una respuesta inmune celular completa.

15 La capacidad de un péptido de unirse a una determinada molécula de MHC de clase II para la presentación en la superficie de una APC depende de una variedad de factores, muy en particular de su secuencia primaria. Esto influirá tanto en su propensión a escisiones proteolíticas como en su afinidad por uniones dentro de la hendidura de unión peptídica de la molécula de MHC de clase II. El complejo MHC de clase II-péptido en la superficie de una APC presenta una cara de unión frente a un determinado receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) capaz de reconocer determinantes provistos tanto por restos expuestos del péptido como por la molécula de MHC de clase II.

20 En la técnica, existen procedimientos para identificar péptidos sintéticos capaces de unirse a moléculas de MHC de clase II (p. ej. documentos WO98/52976 y WO00/34317). Puede que tales péptidos no funcionen como epítopes de células T en todas las situaciones, en particular *in vivo*, debido a las rutas de procesamiento u otros fenómenos. La identificación del epítipo de células T es el primer paso en la eliminación del epítipo. La identificación y eliminación de potenciales epítopes de células T a partir de proteínas se ha descrito previamente. En la técnica, se han proporcionado métodos que posibilitan la detección de epítopes de células T, normalmente medios informáticos que exploran en búsqueda de motivos secuenciales reconocidos en epítopes de células T determinados
25 experimentalmente o bien empleando técnicas por ordenador para predecir péptidos que se unen a MHC de clase II y, en particular, péptidos que se unen a DR. Por tanto, los documentos WO98/52976 y WO00/34317 muestran técnicas de reconocimiento de plegamiento por ordenador para identificar secuencias de polipéptidos con el potencial para unirse a un subgrupo de alotipos DR de MHC de clase II humanos. En estas técnicas se eliminan epítopes de células T predichos mediante el uso de una sustitución razonable de aminoácidos en la secuencia primaria del anticuerpo terapéutico o de la proteína no anticuerpo de derivación humana y no humana.

30 En la materia se han empleado otras técnicas que explotan complejos solubles de moléculas de MHC recombinantes en combinación con péptidos sintéticos y capaces de unirse a clones de células T de muestras de sangre periférica de humanos o animales de experimentación [Kern, F. y col. (1998) *Nature Medicine* 4:975-978; Kwok, W.W. y col. (2001) *TRENDS in Immunology* 22: 583-588] y también pueden explotarse en una estrategia de identificación de epítopes.

35 Como se mostró anteriormente y, como consecuencia de ello, podría ser deseable identificar y eliminar, o al menos reducir, epítopes de células T de un determinado polipéptido, proteína o inmunoglobulina principal terapéuticamente valioso, aunque originalmente inmunogénico.
40

Ya se proporcionó previamente un AcM 425 modificado (documentos US 5,558,864; EP 0531 472) así como versiones quiméricas y humanizadas de c225 (documento WO 96/40210) pero estas técnicas van dirigidas a la reducción de inmunogenicidad a través de la preparación de versiones quiméricas y humanizadas de dichos anticuerpos a partir de las formas murinas mediante métodos convencionales. Tales métodos no reconocen la
45 importancia de los epítopes de células T en las propiedades inmunogénicas de la proteína ni se han concebido para influir directamente en dichas propiedades de un modo específico y controlado según el esquema de la presente invención.

50 Sin embargo, todavía existe la necesidad de obtener anticuerpos anti-EGFR con propiedades mejoradas. Las mejoras deseables incluyen esquemas y modalidades alternativos para la expresión y purificación de dichos agentes terapéuticos pero también y, en especial, mejoras en las propiedades biológicas de la inmunoglobulina. En particular, es necesario mejorar las características *in vivo* cuando se administra a personas. A este respecto, es muy conveniente que se proporcionen anticuerpos anti-EGFR, en especial AcM 425, con un potencial reducido o nulo de inducir una respuesta inmunitaria en humanos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona formas modificadas de anticuerpos anti-EGFR, derivadas del AcM 425, en las que la característica inmunitaria se modifica mediante la reducción o eliminación de varios de los posibles epítopes de células T.

- 5 La invención describe secuencias identificadas dentro de la secuencia primaria de AcM 425 que son potenciales epítopes de células T en virtud del potencial de unión a MHC de clase II.

La invención también describe posiciones específicas dentro de la secuencia primaria de la molécula que, según la invención, pueden modificarse mediante sustitución, adición o delección de aminoácidos específicos sin afectar en esencia la actividad biológica. En casos en los que la pérdida de inmunogenicidad puede conseguirse solo mediante una pérdida simultánea de actividad biológica o especificidad/avidez del anticuerpo, es posible restaurar dichos parámetros mediante modificaciones posteriores dentro de la secuencia de aminoácidos de la variante de anticuerpo.

Asimismo, la invención describe métodos para elaborar tales anticuerpos modificados, y sobre todo, métodos para identificar dichos epítopes de células T que requieren modificación para reducir o eliminar sitios inmunogénicos.

- 15 Cabría esperar que el anticuerpo anti-EGFR modificado según la presente invención muestre un aumento en el tiempo en circulación en humanos y sería especialmente beneficioso en el ámbito de enfermedades crónicas o recurrentes, como es el caso de varias indicaciones. La presente invención proporciona formas modificadas de dichas proteínas de anticuerpo que se espera que muestren propiedades mejoradas *in vivo*. Estas moléculas de anticuerpo anti-EGFR modificadas pueden utilizarse en preparaciones farmacéuticas.

20 En resumen, la invención se refiere a los siguientes aspectos:

- un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo dirigido frente al receptor EGF (Her 1) derivado de AcM 425 que sea sustancialmente no inmunogénico o menos inmunogénico que cualquier anticuerpo original no modificado inmunogénicamente dirigido frente al mismo receptor cuando se exponga al sistema inmunitario de una determinada especie y comparado con el anticuerpo no modificado, donde el anticuerpo modificado incluye, en comparación con el anticuerpo original no modificado, pocas o ninguna secuencia de epítope de células T y/o alotipos de MHC que puedan unirse a péptidos derivados de dicho anticuerpo no modificado;
- un anticuerpo especificado en consecuencia, en el que dichos epítopes de células T originalmente presentes son ligandos de MHC de clase II o secuencias peptídicas que muestran la capacidad de estimular o unirse a células T a través de la presentación en clase II;
- un anticuerpo modificado especificado en consecuencia, en el que se alteran de 1 a 9 restos de aminoácidos, preferiblemente un resto de aminoácido, en cualquiera de los epítopes de células T originalmente presentes;
- un anticuerpo modificado especificado en consecuencia, en el que la alteración de los restos de aminoácidos es sustitución, adición o delección del/de los resto(s) de aminoácido(s) originalmente presente(s) por otro(s) resto(s) de aminoácido(s) en posición(es) específica(s);
- un aminoácido modificado especificado en consecuencia, en el que se lleva a cabo una sustitución, adición o delección adicional de aminoácido(s) específico(s), para reestablecer la actividad biológica de dicha molécula;
- un anticuerpo modificado especificado en consecuencia, en el que la alteración de aminoácido se realiza con referencia a una secuencia proteica homóloga y/o a técnicas de modelado *in silico*;
- un anticuerpo modificado especificado en consecuencia, en el que dicho anticuerpo original no modificado inmunogénicamente incluye secuencias que derivan completa o parcialmente de un origen no humano;
- un anticuerpo modificado especificado en consecuencia, en el que dicho anticuerpo original no modificado inmunogénicamente es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo no humano que incluye restos superficiales excepto aquellos que no se encuentran cerca de las regiones CDR, los cuales derivan de las correspondientes secuencias estructurales humanas (anticuerpo chapado);
- un anticuerpo modificado especificado en consecuencia, que incluye preferiblemente cualquiera de las secuencias expuestas en la Tabla 5;

- una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-EGFR modificado como se ha definido previamente, opcionalmente junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable;
 - una composición farmacéutica o kit correspondiente que incluye otro medicamento farmacológicamente eficaz, preferiblemente un agente citotóxico, más preferiblemente un agente quimioterapéutico;
- 5
- un método de fabricación del anticuerpo modificado o un fragmento del mismo derivado de AcM 425 dirigido frente al receptor EGF (Her 1) que sea sustancialmente no inmunogénico o menos inmunogénico que cualquier anticuerpo original no modificado inmunogénicamente dirigido frente al mismo receptor cuando se expone al sistema inmunitario de una determinada especie y que en comparación con el anticuerpo no modificado consta de las siguientes etapas: (i) determinación de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo original no modificado inmunogénicamente o parte del mismo; (ii) identificación de uno o más epítopes potenciales de células T dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mediante cualquier método que incluya la determinación de la unión de los péptidos de las moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos; (iii) diseño de nuevas variantes de secuencia con uno o más aminoácidos dentro de los epítopes potenciales de células T identificados, modificadas de modo que se reduzca sustancialmente o elimine la actividad del epítipo de células T, según se determinó mediante la unión de los péptidos a moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico*, o ensayos biológicos, o mediante unión de complejos péptido-MHC a células T; (iv) construcción de dichas variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y análisis de dichas variantes para identificar una o más variantes con propiedades deseables; y (v) repetición opcional de las etapas de la (ii) a la (iv);
- 10
- 15
- el método especificado en consecuencia, en el que la etapa (iii) se lleva a cabo mediante sustitución, adición o delección de 1 a 9 restos de aminoácidos en cualquiera de los epítopes de células T originalmente presentes, opcionalmente con referencia a una secuencia proteica homóloga y/o técnicas de modelado *in silico*;
- 20
- un método especificado en consecuencia, en el que la etapa (ii) se lleva a cabo mediante las siguientes etapas: (a) selección de una región del péptido que tenga una secuencia de restos de aminoácidos conocida; (b) fragmentación secuencial de segmentos de restos de aminoácidos solapados de tamaño uniforme predeterminado y constituidos por al menos tres restos de aminoácidos de la región seleccionada; (c) cálculo de la puntuación de unión a molécula de MHC de clase II para cada uno de dichos segmentos fragmentados sumando los valores asignados para cada cadena lateral de resto de aminoácidos hidrofóbica en dicho segmento fragmentado de resto de aminoácidos; y (d) identificación de al menos uno de dichos segmentos como adecuado para modificación, en base a la puntuación de unión a molécula de MHC de clase II calculada para ese segmento, para cambiar la puntuación global de unión a molécula de MHC de clase II para el péptido sin reducir sustancialmente la utilidad terapéutica del péptido;
- 25
- 30
- un método especificado en consecuencia, en el que la etapa (c) se lleva a cabo utilizando un función de puntuación de Böhm modificada para incluir el término 12-6 de energía de repulsión ligando-proteína de Van der Waals y el término de energía conformacional del ligando mediante (1) la provisión de una primera base de datos de modelos de molécula de MHC de clase II, (2) la provisión de una segunda base de datos de cadenas principales peptídicas permitidas de dichos modelos de molécula de MHC de clase II, (3) la selección de un modelo de dicha primera base de datos, (4) la selección de una cadena principal peptídica permitida de dicha segunda base de datos, (5) la identificación de cadenas laterales de restos de aminoácidos presentes en cada segmento fragmentado, (6) la determinación del valor de afinidad de unión para todas las cadenas laterales presentes en cada segmento fragmentado, y la repetición de las etapas de la (1) a la (5) para cada uno de dichos modelos y cada una de dichas cadenas principales;
- 35
- 40
- un método especificado en consecuencia, en el que se utiliza un anticuerpo original no modificado inmunogénicamente que incluye secuencias que derivan completa o parcialmente de un origen no humano;
- 45
- un método especificado en consecuencia, en el que dicho anticuerpo original no modificado inmunogénicamente es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo no humano que incluye restos superficiales excepto aquellos que no se encuentran cerca de las regiones CDR, los cuales derivan de las correspondientes secuencias estructurales de referencia humanas (anticuerpo chapado);
- 50
- un método especificado en consecuencia, en el que dicho anticuerpo original no modificado inmunogénicamente es un anticuerpo murino, preferiblemente AcM 425 murino;
- un uso de un péptido 13mérico de epítipo de células T, preferiblemente un péptido de al menos 9 restos de aminoácidos consecutivos de dicho epítipo 13mérico de células T que presenta una actividad de unión potencial a MHC de clase II y creado a partir de un anticuerpo no modificado inmunogénicamente para la fabricación de un anticuerpo modificado inmunogénicamente que tenga una inmunogenicidad sustancialmente nula o reducida

cuando se utiliza *in vivo* en comparación con dicho anticuerpo no modificado, todos los anticuerpos especificados previamente y en las reivindicaciones.

El método general de la presente invención que conduce a los anticuerpos anti-EGFR modificados según la invención consta de las siguientes etapas:

5 (a) determinación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o parte del mismo;

(b) identificación de uno o más epítopes potenciales de células T en la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina mediante cualquier método que incluya la determinación de la unión de los péptidos a las moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos;

10 (c) diseño de nuevas variantes de secuencia con uno o más aminoácidos en los posibles epítopes de células T modificados de modo que se reduzca sustancialmente o se elimine la actividad del epítope de células T según se determina mediante la unión de los péptidos a las moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos. Estas variantes de secuencia se construyen de modo que se evite la creación de nuevos posibles epítopes de células T mediante las variaciones de secuencia excepto que estos nuevos posibles epítopes de células T, a su vez, se modifiquen de modo que se reduzca sustancialmente o se elimine la actividad del epítope de células T; y

15 (d) construcción de estas variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y análisis de dichas variantes para identificar una o más variantes con las propiedades deseables según técnicas recombinantes bien conocidas.

20 La identificación de epítopes potenciales de células T según la etapa (b) puede llevarse a cabo según los métodos previamente descritos en la técnica previa. Se describen métodos adecuados en los documentos WO 98/59244; WO 98/52976; WO 00/34317 y pueden utilizarse preferiblemente para identificar la propensión a la unión de péptidos derivados de AcM 425 frente a una molécula de MHC de clase II.

Otro método muy eficaz para identificar epítopes de células T mediante cálculo se describe en el EJEMPLO, que es una realización preferida según esta invención.

25 En la práctica, se producirán y analizarán diversas variantes de inmunoglobulinas anti-EGFR, preferiblemente AcM 425, para determinar si presenta las características inmunes y funcionales deseadas. Los anticuerpos variantes se obtendrán preferentemente mediante técnicas de ADN recombinante, aunque pueden contemplarse otros procedimientos que incluyan síntesis química de fragmentos de anticuerpo.

30 La invención se refiere a análogos de anticuerpo en el que se han efectuado sustituciones de al menos un resto de aminoácido en posiciones que dan lugar a una reducción sustancial de la actividad o la eliminación de uno o más epítopes potenciales de células T a partir de la proteína. Una o más sustituciones de aminoácidos en determinados puntos dentro de cualquiera de los posibles ligandos de MHC de clase II identificadas en la Tabla 1 puede dar lugar a un AcM 425 con un potencial inmunogénico reducido cuando se administra como agente terapéutico al hospedador humano. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos se hacen en puntos adecuados dentro de la

35 secuencia peptídica predicha para conseguir una reducción sustancial o eliminación de la actividad del epítope de células T. En la práctica, un punto adecuado equivaldrá preferiblemente a un resto de aminoácido que se une dentro de uno o más bolsillos del interior del surco de unión de MHC de clase II.

40 Se prefiere más alterar la unión dentro del primer bolsillo de la hendidura en la llamada posición P1 o ancla P1 del péptido. Se reconoce que la calidad de la interacción de unión entre el resto del ancla P1 del péptido y el primer bolsillo del surco de unión de MHC clase II es un determinante importante de la afinidad total de unión para el péptido completo. Una sustitución adecuada en esta posición del péptido será, para un resto menos fácilmente alojado dentro de bolsillo, por ejemplo, la sustitución por un resto más hidrófilo. También se consideran y entran en el alcance de la presente los restos de aminoácidos en el péptido en las posiciones equivalentes a la unión dentro de otras regiones del bolsillo dentro de la hendidura de unión de MHC.

45 Se entiende que las sustituciones de aminoácidos individuales dentro de un posible epítope de células T determinado son la vía más preferida para eliminar el epítope. Pueden contemplarse combinaciones de sustituciones dentro de un único epítope y, por ejemplo, pueden ser particularmente adecuadas cuando se solapan entre sí epítopes definidos individualmente. Además, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos individualmente dentro de un epítope determinado o en combinación dentro de un único epítope en posiciones que no equivalgan a los

50 «restos del bolsillo» con respecto al surco de unión de MHC de clase II, sino en cualquier punto dentro de la secuencia peptídica. Las sustituciones pueden realizarse con referencia a una estructura homóloga o método estructural producido utilizando técnicas *in silico* conocidas en la materia y pueden basarse en características

estructurales conocidas de la molécula según esta invención. Todas estas sustituciones entran dentro del alcance de la presente invención.

Las sustituciones de aminoácidos en péptidos distintos a los identificados previamente pueden contemplarse en particular cuando se realizan en combinación con sustitución(es) efectuada(s) dentro de un péptido de la lista. Por ejemplo, puede contemplarse un cambio para restaurar la estructura o la actividad biológica de la molécula variante. Tales cambios compensatorios y cambios para incluir delección o adición de determinados restos de aminoácidos del anticuerpo anti-EGFR que dan lugar a una variante con una actividad deseada y en combinación con cambios en cualquiera de los péptidos descritos entran dentro del alcance de la presente invención.

En tanto que esta invención se refiere a anticuerpos anti-EGFR modificados, preferiblemente AcM 425, deberían considerarse dentro del alcance de la invención composiciones que contengan tales inmunoglobulinas modificadas o fragmentos de las mismas, proteínas de fusión de las mismas y composiciones relacionadas. En otro aspecto, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-EGFR modificados, preferiblemente AcM 425. En otro aspecto más, la presente invención se refiere a métodos para el tratamiento terapéutico de humanos empleando inmunoglobulinas modificadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se debe puntualizar que el término «*inmunogenicidad menor o reducida*», utilizado previamente y en adelante, es un término relativo y se refiere a la inmunogenicidad del anticuerpo fuente original respectivo cuando se expone *in vivo* a la misma especie en contraposición al anticuerpo modificado según la invención. Por consiguiente, el anticuerpo fuente puede ser un anticuerpo completamente no humano, por ejemplo, de ratón o rata. Sin embargo, la invención también se refiere a anticuerpos que ya contienen secuencias humanas, tales como anticuerpos quiméricos o humanizados. En estos anticuerpos diseñados artificialmente obtenidos mediante métodos convencionales clásicos, existen secuencias dentro de la estructura primaria que todavía son inmunogénicas. También es posible que a la vez que se crean tales versiones quiméricas o humanizadas mediante métodos conocidos, se generen nuevos epítopes de células T. Incluso anticuerpos completamente humanos o fragmentos de los mismos pueden ser inmunogénicos para determinados seres humanos o grupos de humanos que presenten un patrón genético inmunológicamente distinto. El término «*anticuerpo quimérico*» significa anticuerpos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a fragmentos de estos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (p. ej., documento US 4.816.567; Morrison y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los métodos para obtener anticuerpos quiméricos y humanizados son también conocidos en la técnica. Por ejemplo, entre los métodos para obtener anticuerpos quiméricos se incluyen los descritos en las patentes de Boss (Celltech) y Cabilly (Genentech) (documentos US 4.816.397 y US 4.816.567). Los «*anticuerpos humanizados*» son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (p. ej., de roedores) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región hipervariable (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas circunstancias, los restos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y generalmente dos, dominios variables completos, en los que todos, o sustancialmente todos, los lazos hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todos, o sustancialmente todos, los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de la inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Los métodos para la obtención de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en Winter (documento US 5.225.539) y Boss (Celltech, documento US 4.816.397). Los «*fragmentos de anticuerpo*» comprenden una porción de un anticuerpo intacto que, preferiblemente, comprende la región de unión al antígeno o la región variable de la misma. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y Fc, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo. Un «*anticuerpo intacto*» es aquel que comprende una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras. La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos «*Fab*», incluyendo cada uno un único sitio de unión al antígeno y una CL y una región CH1, y un fragmento «*Fc*» residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. La región «*Fc*» de los anticuerpos comprende, por norma, CH2, CH3 y la región bisagra de una clase principal de anticuerpo IgG1 o IgG2. El tratamiento con pepsina da lugar a un fragmento «*F(ab')₂*» que tiene dos sitios de unión al antígeno y todavía es capaz de entrecruzar el antígeno. «*Fv*» es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. Esta región consta de un dímero de una cadena

pesada y un dominio variable de la cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Los fragmentos de anticuerpo «Fv de cadena sencilla» o «scFv» comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, que se presentan como una cadena polipeptídica sencilla. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permiten al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Se conocen anticuerpos Fv de cadena sencilla, por ejemplo, de Plückerthun (*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994)), documentos WO93/16185, US 5.571.894, US 5.587.458; Huston y col. (1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5879) o de Skerra y Plueckthun (1988, *Science* 240, 1038).

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

El término «proteína/anticuerpo modificado», según se usa en esta invención, describe una proteína/anticuerpo que presenta un número reducido de epítotope de células T y, por tanto, provoca una inmunogenicidad reducida en relación a la proteína original cuando se expone al sistema inmunitario de una determinada especie. El término «proteína no modificada», según se usa en esta invención, describe la «proteína original» en contraposición con la «proteína modificada», que presenta un mayor número de epítotope de células T y, por tanto, una inmunogenicidad aumentada en relación a la proteína modificada cuando se expone al sistema inmunitario de una determinada especie.

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

En los siguientes párrafos se describe más detalladamente la invención para el anticuerpo anti-EGFR 425 monoclonal, el cual ha demostrado tener un elevado valor terapéutico. Sin embargo, la invención no se limita a este anticuerpo y a sus diversas formas existentes, sino que se puede extender a otros anticuerpos anti-EGFR, sobre todo al anticuerpo 225 quimérico, el cual presenta unas propiedades muy similares.

A menos que se determine lo contrario, todos los aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras variables se numeran tal como establece el documento Kabat y col., 1991 (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services). Los epítotope potenciales de células T se numeran con el número lineal del primer aminoácido de un epítotope contando desde el primer aminoácido de las cadenas pesadas y ligeras.

1. Comparación con las estructuras del subgrupo del ratón

Las secuencias de aminoácidos de VH (cadena pesada) y VK (cadena ligera) 425 murinas se compararon con secuencias de consenso para los subgrupos de cadena pesada y ligera murinos de Kabat. VH 425 puede asignarse al subgrupo IIB de cadenas pesadas de ratón. La comparación con la secuencia consenso para este subgrupo muestra que la serina en la posición 94 de VH 425 es poco común. El resto más común en esta posición es la arginina. VK 425 puede asignarse al subgrupo V1 de cadenas kappa de ratón. La comparación con la secuencia consenso para este subgrupo muestra que los restos en las posiciones 45-47, 60 y 100 de VK 425 son poco comunes para este subgrupo. La numeración de los restos de aminoácido se efectúa según Kabat.

2. Comparación con estructuras humanas

Las secuencias de aminoácidos de VH (cadena pesada variable) y VK (cadena ligera kappa variable) 425 murinas se compararon con las secuencias del directorio de línea germinal VH (Tomlinson, I.M y col., (1992) J. Mol.Biol. 227: 776-798) y VK (Cox, J.P.L. y col., (1994) Eur. J. Immunol. 24:827-836) humanas y también con secuencias de la región J de la línea germinal humana (Routledge, E.G. y col., en, *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man*, Clark, M. ed. Academic Titles, Nottingham, UK, págs. 13-44, 1991). La secuencia 425 murina de la cadena pesada y ligera puede tomarse, por ejemplo, del documento EP 0531 472.

La estructura humana de referencia seleccionada para VH 425 fue VH1GRR con JH6 humano. La secuencia de VH1GRR del directorio termina en el resto 88. Por consiguiente, no existe un resto que corresponda a la serina poco común de la posición 94 de la secuencia murina. Esta secuencia de línea germinal se ha encontrado en un gen de anticuerpo maduro reorganizado con 4 cambios de aminoácido. La estructura humana de referencia seleccionada para VK 425 fue L6/vg con JK2 humano. Esta secuencia de línea germinal se ha encontrado en una cadena pesada de anticuerpo maduro reorganizado sin cambios de aminoácido.

3. Diseño de secuencias «chapadas»

Tras la identificación de las secuencias estructurales humanas de referencia, se modificaron determinados restos de aminoácido no idénticos dentro de las estructuras de VH y VK 425 por los aminoácidos correspondientes de la secuencia estructural de referencia humana. Se excluyeron de este proceso, y no se alteraron, restos que se consideran esenciales para la estructura del anticuerpo y la unión. Los restos de murino que se mantuvieron en esta etapa son principalmente restos enterrados no superficiales, aparte de los restos de la región N-terminal, por ejemplo, que se encuentran cerca de las CDR en el anticuerpo final (de 1 a 8 restos de aminoácido, preferiblemente de 1 a 5). Este proceso produce una secuencia que es, en líneas generales, similar a un anticuerpo «chapado» puesto que los restos superficiales son principalmente humanos y los restos enterrados son como en la secuencia murina original.

4. Análisis del plegamiento peptídico

Las secuencias murinas y chapadas de VH y VK 425 se analizaron mediante el método correspondiente de la invención. Las secuencias de aminoácidos se dividen en todos los 13meros posibles. Los péptidos 13méricos se presentan secuencialmente a los modelos de surco de unión de los alotipos HLA-DR y se asigna una puntuación de unión a cada péptido para cada alelo. Se calcula una puntuación conformacional para cada cadena lateral del péptido unida a bolsillo. Esta puntuación se basa en el solapamiento estérico, los posibles enlaces de hidrógeno entre el péptido y los restos del surco de unión, las interacciones electrostáticas y los contactos favorables entre el péptido y los restos del bolsillo. A continuación, se modifica la conformación de cada cadena lateral y se recalcula la puntuación. Una vez determinada la mayor puntuación conformacional, se calcula la puntuación de unión basándose en los restos hidrófobos unidos al surco, los restos hidrófilos que no se encuentran en el surco y el número de restos que caben dentro del surco de unión. Los péptidos que se sabe que se unen a MHC de clase II humano obtienen una puntuación de unión elevada sin apenas falsos negativos. Por consiguiente, los péptidos que obtienen una puntuación de unión significativa en el análisis actual se consideran epítopes potenciales de células T. Los resultados del análisis del plegamiento peptídico se muestran en la Tabla 1 para VH 425 y VK 425. Se hace referencia a los epítopes potenciales de células T mediante el número lineal del primer resto del 13mero.

Tabla 1: Epítopes potenciales de células T en secuencias 425 murinas y chapadas

| Secuencia | Número de epítopes potenciales de células T | Número del primer resto de 13mero con número de alelos enlazantes en paréntesis |
|----------------|---|---|
| VH 425 murino | 8 | 31(7), 35(17), 43(7), 46(8), 58(10), 62(12), 81(11), 84(16) |
| VH 425 chapado | 7 | 31(7), 43(7), 46(8), 58(10), 62(11), 81(11), 84(16) |
| VK 425 murino | 9 | 1(8), 2(5), 17(5), 27(5), 43(16), 72(18), 75(10), 92(10), 93(17) |
| VK 425 chapado | 4 | 27(5), 43(16), 92(8), 93(17) |

5. Eliminación de los epítopes potenciales de células T

La numeración de los restos de aminoácidos para sustitución es efectúa según Kabat. Se hace referencia a los epítopes potenciales de células T mediante el número lineal del primer resto del 13mero.

5 Las sustituciones de aminoácidos requeridas para eliminar los epítopes potenciales de células T de la región variable de la cadena pesada del 425 chapado fueron las siguientes:

- La sustitución de prolina por alanina en el resto 41 (número Kabat 41) elimina el epítope potencial del resto número 31.
- 10 • La sustitución de prolina por leucina en el resto 45 (número Kabat 45) elimina el epítope potencial del resto número 43. En una secuencia VH de una línea germinal humana, DP52, se encuentra una prolina en la posición 45.
- La sustitución de alanina por isoleucina en el resto 48 (número Kabat 48) elimina el epítope potencial del resto número 46.
- La sustitución de valina por alanina en el resto 68 (número Kabat 67) elimina el epítope potencial del resto número 58.
- 15 • La sustitución de isoleucina por leucina en el resto 70 (número Kabat 69) elimina el epítope potencial del resto número 62.
- La sustitución de treonina por serina en el resto 91 (número Kabat 87) elimina el epítope potencial de los restos número 81 y 84.

20 Las sustituciones de aminoácidos requeridas para eliminar los epítopes potenciales de células T de la región variable de la cadena ligera del 425 chapado fueron las siguientes:

- La sustitución de histidina por tirosina en el resto 35 (número Kabat 36) elimina el epítope potencial del resto número 27.
- La sustitución de alanina por treonina en el resto 50 (número Kabat 51) elimina el epítope potencial del resto número 43. Este resto está dentro de CDR2. Normalmente se encuentra alanina en esta posición tanto en anticuerpos humanos como murinos. Una sustitución alternativa para eliminar este epítope es alanina por leucina en la posición 45 (número Kabat 46). No existe ninguna sustitución conservadora que elimine el epítope potencial. Se encuentra alanina en esta posición en algunos anticuerpos.
- 25 • La sustitución de prolina por isoleucina en el resto 94 (número Kabat 95) elimina el epítope potencial en el resto número 92. El resto Kabat 95 está dentro de CDRL3. La prolina es común en esta posición en secuencias de anticuerpos de ratón y no existe cambio alguno más allá de la CDR que elimine el epítope potencial.
- 30 • La sustitución de valina por leucina en el resto 103 (número Kabat 104) elimina el epítope potencial en el resto número 93.

6. Diseño de secuencias desinmunizadas

35 Se diseñaron secuencias de región variable de cadena pesada y ligera desinmunizadas con referencia a los cambios requeridos para eliminar los epítopes potenciales de células T y teniendo en cuenta los restos estructurales que pueden ser críticos para la estructura del anticuerpo y la unión. Además de las secuencias desinmunizadas basadas en la secuencia chapada, se diseñó una secuencia adicional para cada VH y VK en base a la secuencia murina, llamada versión plegada de péptido de ratón (Mo PT, por sus siglas en inglés). Para esta versión, se realizaron cambios directamente en la secuencia murina para eliminar los epítopes de células T, pero solo se realizan cambios más allá de las CDR que no se consideran perjudiciales para la unión. No se ha intentado eliminar los epítopes superficiales (células B) en esta versión de la secuencia desinmunizada. El VH desinmunizado primario incluye las sustituciones de la 1 a la 6 del apartado 5 anterior y no incluye epítopes potenciales de células T. Se diseñaron otras 4 secuencias de VH desinmunizadas para examinar el efecto de las distintas sustituciones requeridas sobre la unión del anticuerpo. Las modificaciones acumuladas efectuadas en la secuencia primaria desinmunizada 45 (VH1GRR-VH-v1 425) y los epítopes potenciales de células T restantes se detallan en la Tabla 2. La versión plegada de ratón se incluye a modo comparativo.

Tabla 2: Cambios de aminoácidos y epítopes potenciales en VH 425 desinmunizado

| Variante | Cambios de restos acumulados | Epítopes potenciales de células T |
|------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| VH1GRR-VH-v1 425 | Ninguno | Ninguno |
| VH1GRR-VH-v2 425 | 48A → I | 46(8) |
| VH1GRR-VH-v3 425 | 45P → L | 43(7), 46(8) |
| VH1GRR-VH-v4 425 | 67V → A, 69I → L | 43(7), 46(8), 58(10), 62(11) |
| VH1GRR-VH-v5 425 | 41P → A | 31(7), 43(7), 46(8), 58(10), 62(11) |
| VH-MoPT 425 | N/A | 43(7), 46(8) |

5 El VK desinmunizado primario incluye las sustituciones de la 1 a la 4 del apartado 5 anterior y no incluye epítopes potenciales de células T. Se diseñaron otras 4 secuencias de VK desinmunizadas para examinar el efecto de las distintas sustituciones requeridas sobre la unión del anticuerpo. La versión 2 es una alternativa a la versión 1 en la que se ha utilizado una sustitución alternativa para eliminar el mismo epítope potencial de células T. Las modificaciones acumuladas efectuadas en la secuencia desinmunizada primaria (L6-vg-VK-v1 425) y los epítopes potenciales de células T restantes se detallan en la Tabla 3. La versión plegada de ratón se incluye a modo comparativo.

10 Tabla 3: Cambios de aminoácidos y epítopes potenciales en VK 425 desinmunizado

| Variante | Cambios de restos acumulados | Epítopes potenciales de células T |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------------|
| L6-vg-VK-v1 425 | Ninguno | Ninguno |
| L6-vg-VK-v1 425 | 51 A → T, 46L → A | Ninguno |
| L6-vg-VK-v1 425 | 46 A → L | 43(16) |
| L6-vg-VK-v1 425 | 95 P → I | 43(16), 92(8) |
| L6-vg-VK-v1 425 | 36 H → Y | 27(5), 43(16), 92(8) |
| VK-MoPT 425 | N/A | 27(5), 43(16), 92(8) |

Tabla 4: Secuencias originales y «chapadas» de VH y VK de AcM 425 murino

VH 425 ratón

15 QVQLQQPGAELVPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWWVKQRAGQGLEWIGEFNPSNGRNTNYNEKFKSKATLTVDKS
SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTLTVSS

VK 425 ratón

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLSAGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRME
AEDAATYYCQQWSSHIFTFGSGTKLEIK

VH 425 chapado:

20 QVQLVQSGAELVPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWWKQAAGQGLEWIGEFNPSNGRNTNYNEKFKSRATLTVDKS
TSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTLTVSS

ES 2 398 099 T3

VK 425 chapado:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWYQQKPGQSPRLLIYDTSNLAGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLE
AEDAATYYCQQWSSHIFTFGQGTKLEIK

Tabla 5: Secuencias desinmunizadas de cadena variable pesada y ligera de AcM 425

5 *VH1 425 desinmunizado*

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGPEWAGEFNPSNGRNTNYNEKFKSRVTITVDKS
TSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTLTVSS

VK1 425 desinmunizado

10 QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQQKPGQSPRLLIYDASNLAGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLE
AEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH2 425 desinmunizado

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFNPSNGRNTNYNEKFKSRVTITVDKST
STAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTLTVSS

VK2 425 desinmunizado

15 QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQQKPGQSPRALIYDTSNLAGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLE
AEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH3 425 desinmunizado

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFNPSNGRNTNYNEKFKSRVTITVDKST
STAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTLTVSS

20 VK3 425 desinmunizado

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQQKPGQSPRLLIYDTSNLAGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLE
AEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH4 425 desinmunizado

25 QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFNPSNGRNTNYNEKFKSRATLTVDKS
TSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTLTVSS

VK4 425 desinmunizado

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQQKPGQSPRLLIYDTSNLAGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLE
AEDAATYYCQQWSSHIFTFGQGTKVEIK

VH5 425 desinmunizado

30 QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWKQAAGQGLEWIGEFNPSNGRNTNYNEKFKSRATLTVDKS
TSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTLTVSS

VK5 425 desinmunizado

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWYQQKPGQSPRLLIYDTSNLAGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLE
AEDAATYYCQQWSSHIFTFGQGTKVEIK

35 VH 425 ratón, péptido plegado (Mo PT)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFNPSNGRNTNYNEKFKSRVTITVDKS
SSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTLTVSS

VK 425 ratón, péptido plegado (Mo PT)

QIVLTQSPATLSASPGEKATMTCSSASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPRFSGSGSGTSSYSLTISRLE
AEDAATYYCQQWSSHIFTFGQGTKVEIK

5 Como ya se ha mencionado, los anticuerpos anti-EGFR modificados según la invención, preferiblemente el AcM 425, pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas o kits farmacéuticos para el tratamiento de cáncer. Los términos «cáncer» y «tumor» se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Mediante las composiciones farmacéuticas según la presente invención, pueden tratarse tumores como los de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, cuello del útero e hígado.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender agentes que reducen o evitan los efectos secundarios asociados con la politerapia de la presente invención («terapia complementaria»), incluyendo, pero sin limitaciones, aquellos agentes que, por ejemplo, reducen el efecto tóxico de los fármacos antineoplásicos, p. ej., inhibidores de la resorción ósea o agentes cardioprotectores. Dichos agentes auxiliares previenen o reducen la incidencia de náuseas y vómitos asociados con quimioterapia, radioterapia o intervención quirúrgica, o reducen la incidencia de infección asociada con la administración de fármacos antineoplásicos mielodepresores. Los agentes auxiliares son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos modificados según la invención pueden administrarse adicionalmente con adyuvantes como BCG y otros estimuladores del sistema inmunitario. Adicionalmente, las composiciones pueden incluir agentes quimioterapéuticos como los descritos previamente que contienen isótopos marcados radioactivamente eficaces como citotóxicos u otros agentes citotóxicos, como péptidos citotóxicos (p. ej., citocinas) o fármacos citotóxicos y similares. Los kits farmacéuticos para tratar tumores o metástasis tumorales aluden a un envase y, por lo general, a instrucciones de uso de los reactivos en métodos para tratar tumores y metástasis tumorales. Un reactivo de un kit de esta invención típicamente se formula como una composición terapéutica como se describe en este documento y, por tanto, puede estar en cualquiera de diversas formas adecuadas para su distribución en un kit. Estas formas pueden incluir un líquido, polvo, comprimido, suspensión y la formulación similar para proporcionar el antagonista y/o la proteína de fusión de la presente invención. Los reactivos pueden proporcionarse en recipientes independientes adecuados para su administración por separado según los métodos actuales o, alternativamente, pueden proporcionarse combinados en una composición en un único recipiente en el envase. El envase puede contener una cantidad suficiente para una o más dosis de reactivo según los métodos de tratamiento descritos en este documento. Un kit de esta invención también contiene «instrucciones de uso» de los materiales contenidos en el envase. Vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables y las variaciones gramaticales de los mismos son materiales capaces de su administración a o sobre un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos no deseados, como náuseas, mareos, molestias gástricas y similares.

35 La preparación de una composición farmacológica que contiene principios activos disueltos o dispersos en ella es bien conocida en la técnica y no es necesario limitarse en base a su formulación. Típicamente, estas composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas; sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensiones en líquido antes de su uso. La preparación también puede emulsionarse. El principio activo puede mezclarse con excipientes que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares como agente humectantes o emulsionantes, agentes para tamponar el pH y similares que potencian la eficacia del principio activo. La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes que contiene.

50 Normalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-EGFR es una cantidad tal que cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente para conseguir una concentración en plasma de entre 0,01 microgramos (μg) por mililitro (ml) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente de entre 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y, por lo general, sobre 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Establecidas de forma diferente, las dosis pueden variar de 0,1 mg/kg a unos 300 mg/kg, preferiblemente de 0,2 mg/kg a unos 200 mg/kg, más preferiblemente de 0,5 g/kg a unos 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias durante uno o varios días. Por lo general, se pueden aplicar dosis inferiores a las que se acaban de indicar con la misma eficacia si los anticuerpos inmunogénicamente modificados según la invención se utilizan en lugar de las versiones no modificadas correspondientes.

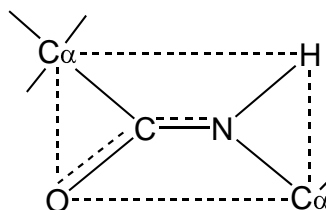
55 En los casos en que sea necesaria o se recomiende la politerapia, por ejemplo con agentes quimioterapéuticos, la dosis típica de principio activo de este tipo es de 10 mg a 1000 mg, preferiblemente entre 20 y 200 mg, y más preferiblemente de 50 a 100 mg por kilo de masa corporal por día.

El siguiente ejemplo describe de forma general un método de identificación de epítopes de células T presentes en los anticuerpos originales con un potencial inmunogénico no modificado según la invención. La identificación de dichas secuencias de epítopo puede efectuarse, sin embargo, a través de métodos conocidos como se ha especificado previamente.

5 EJEMPLO

Existen muchos factores que juegan un papel importante en la determinación de la estructura total de una proteína, polipéptido o inmunoglobulina. En primer lugar, el enlace peptídico, es decir, el enlace que une los aminoácidos de la cadena, es un enlace covalente. Este enlace presenta una estructura plana, fundamentalmente una amida sustituida. Una «amida» es cualquier grupo de compuestos orgánicos que contiene el grupo -CONH-.

- 10 El enlace peptídico plano que une $C\alpha$ de aminoácidos adyacentes puede representarse como se ilustra a continuación:



- 15 Puesto que los átomos O=C y C-N se encuentran en un plano relativamente rígido, no se produce una rotación libre alrededor de estos ejes. Por consiguiente, un plano representado por la línea discontinua se denomina a veces plano «amida» o «plano peptídico» en el que se encuentran los átomos de oxígeno (O), carbono (C), nitrógeno (N) e hidrógeno (H) de la cadena principal peptídica. En los extremos opuestos de este plano amida se localizan los átomos $C\alpha$. Puesto que no existe una rotación sustancial alrededor de los átomos C=O y C-N del plano peptídico o amida, entonces una cadena polipeptídica se compone de una serie de uniones peptídicas planas que unen los átomos $C\alpha$.

- 20 Un segundo factor que juega un papel importante en la definición de la estructura o conformación total del polipéptido o proteína es el ángulo de rotación de cada plano amida alrededor del enlace $C\alpha$ común. Los términos «ángulo de rotación» y «ángulo de torsión» se considerarán equivalentes en adelante. Si se supone que los átomos de O, C, N y H permanecen en el plano amida (lo cual normalmente es una suposición válida, aunque puede que existan ligeras desviaciones de la planaridad de estos átomos en algunas conformaciones), estos ángulos de rotación definen la conformación N y R de la cadena principal del polipéptido, es decir, la estructura tal y como existe entre restos adyacentes. Estos dos ángulos se conocen como ϕ y ψ . Por consiguiente, un conjunto de ángulos ϕ_i , ψ_i , donde el subíndice i representa un determinado resto de una cadena polipeptídica, define eficazmente la estructura secundaria del polipéptido. La convención que se usa para definir los ángulos ϕ , ψ , es decir, los puntos de referencia en los que los planos amida forman un ángulo de cero grados, y la definición de qué ángulo es ϕ y qué ángulo es ψ , para un determinado polipéptido, están definidas en la bibliografía, véase por ejemplo Ramachandran y col. *Adv. Prot. Chem.* **23**:283-437 (1968), págs. 285-94.

- 35 El presente método puede aplicarse a cualquier proteína y, en parte, se basa en el descubrimiento de que en los humanos la posición ancla de Bolsillo 1 primaria de los surcos de unión a molécula de MHC de clase II presenta una especificidad bien diseñada para determinadas cadenas laterales de aminoácidos. La especificidad de este bolsillo viene determinada por la identidad del aminoácido de la posición 86 de la cadena beta de la molécula de MHC de clase II. Este sitio se encuentra en el fondo del Bolsillo 1 y determina el tamaño de la cadena lateral que este bolsillo puede acomodar. Marshall, K.W., *J. Immunol.*, **152**:4946-4956 (1994). Si este resto es una glicina, entonces todos los aminoácidos alifáticos hidrófobos y aromáticos (siendo los alifáticos hidrófobos: valina, leucina, isoleucina, metionina y siendo los aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano) pueden acomodarse en el bolsillo, prefiriéndose las cadenas laterales aromáticas. Si este resto del bolsillo es una valina, entonces las cadenas laterales de este aminoácido sobresale hacia el interior del bolsillo y restringe el tamaño de las cadenas peptídicas laterales que pueden acomodarse de modo que solo pueden acomodarse las cadenas laterales alifáticas hidrófobas. Por tanto, en una secuencia de restos de aminoácidos, dondequiera que se encuentre un aminoácido con una cadena lateral alifática hidrófoba o aromática, es posible que esté presente un epítopo de células T restringido a MHC de clase II.
- 45 Sin embargo, si la cadena lateral es alifática hidrófoba, es aproximadamente dos veces más probable que esté

asociada a un epítope de células T que una cadena lateral aromática (suponiendo una distribución aproximadamente equilibrada de los tipos de Bolsillo 1 en la población global).

Un método por ordenador que incluye la presente invención perfila la probabilidad de que regiones peptídicas contengan epítopes de células T como sigue:

- 5 (1) Se explora la secuencia primaria de un segmento peptídico de longitud predeterminada y se identifican todas las cadenas laterales alifáticas hidrófobas y aromáticas presentes. (2) Se asigna a las cadenas laterales alifáticas hidrófobas un valor mayor al de las cadenas laterales aromáticas, preferiblemente aproximadamente el doble del valor asignado a las cadenas laterales aromáticas, por ejemplo, un valor de 2 para una cadena lateral alifática hidrófoba y un valor de 1 para una cadena lateral aromática. (3) Se suman los valores que se determina que están
10 presentes para todos los segmentos (ventana) de restos de aminoácidos que se solapan de longitud uniforme predeterminada dentro del péptido, y se asigna el valor total para un determinado segmento (ventana) a un único resto de aminoácido en una posición intermedia del segmento (ventana), preferiblemente a un resto a aproximadamente la mitad del segmento (ventana) fragmentado. Se repite este procedimiento para todos los segmentos de restos de aminoácidos solapados fragmentados. Por tanto, se asigna a todos los restos de aminoácidos un valor que
15 está relacionado con la probabilidad de que un epítope de células T esté presente en ese determinado segmento (ventana). (4) Los valores calculados y asignados como se describe en la anterior etapa 3 pueden representarse frente a las coordenadas de aminoácido de la secuencia de aminoácidos completa que se va a evaluar. (5) Se considera que todas las porciones de la secuencia que tienen una puntuación de un determinado valor, p. ej., un valor de 1, probablemente contengan un epítope de células T y pueden modificarse, si se desea.
- 20 Este aspecto particular de la presente invención proporciona un método general mediante el cual pueden describirse las regiones peptídicas que probablemente contengan epítopes de células T. Las modificaciones en estas regiones del péptido tienen el potencial de modificar las características de unión a MCH de clase II.

Según otro aspecto de la presente invención, los epítopes de células T pueden predecirse con mayor exactitud mediante el uso de un método por ordenador más sofisticado que tenga en cuenta las interacciones de los péptidos con modelos de alelos de MHC de clase II.
25

La predicción por ordenador de epítopes de células T presentes en un péptido según este aspecto particular contempla la construcción de modelos de al menos 42 alelos de MHC de clase II basados en las estructuras de todas las moléculas de MHC de clase II conocidas y un método para el uso de estos modelos en la identificación por ordenador de epítopes de células T, la construcción de bibliotecas de cadenas principales peptídicas para cada
30 modelo para tener en cuenta la variabilidad conocida en las posiciones relativas de los carbonos alfa de la cadena principal peptídica, la construcción de bibliotecas de conformaciones de cadena lateral de aminoácidos para cada acoplamiento de la cadena principal con cada modelo para cada una de las 20 opciones de aminoácido en las posiciones críticas para la interacción entre el péptido y la molécula de MHC de clase II, y el uso de estas bibliotecas de cadenas principales y conformaciones de cadena lateral junto con una función de puntuación para seleccionar la
35 cadena principal y la conformación de cadena lateral óptimas para un péptido en particular acoplado con una molécula de MHC de clase II particular y la derivación de una puntuación de unión a partir de esta interacción.

Se pueden derivar modelos de moléculas de MHC de clase II mediante modelado comparativo a partir de varias estructuras similares encontradas en la Base de Datos de Proteínas de Brookhaven («PDB», por sus siglas en inglés). Estos pueden obtenerse mediante el uso de un software de modelado comparativo semiautomático
40 (Modeller, Sali A. y Blundell T.L., 1993. *J. Mol Biol* 234:779-815), el cual incorpora una función de recocido simulado, junto con el campo de fuerzas CHARMM para minimizar la energía (comercializado por Molecular Simulations Inc., San Diego, California, EE.UU.). También se pueden utilizar métodos de modelado alternativos.

El presente método difiere significativamente de otros métodos por ordenador que utilizan bibliotecas de datos de unión derivados experimentalmente de cada alternativa de aminoácido en cada posición del surco de unión para un conjunto pequeño de moléculas de MHC de clase II (Marshall, K.W., y col., *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids*,
45 1(3):157-162) (1995) o incluso otros métodos por ordenador que usan datos de unión experimentales similares para definir las características de unión de determinados tipos de bolsillos de unión dentro del surco, utilizando de nuevo un subconjunto relativamente pequeño de moléculas de MHC de clase II, y luego «combinando» tipos de bolsillos a partir de esta biblioteca de bolsillos para crear artificialmente otras moléculas de MHC de clase II «virtuales»
50 (Sturniolo T., y col., *Nat. Biotech*, 17(6): 555-561 (1999). Ambos métodos anteriores presentan el inconveniente principal de que, debido a la complejidad de los ensayos y la necesidad de sintetizar grandes números de variantes peptídicas, solo pueden explorarse experimentalmente un pequeño número de moléculas de MHC de clase II. Por esto, el primer método anterior solo puede predecir un pequeño número de moléculas de MHC de clase II. El segundo método anterior también supone que un bolsillo en una molécula cubierto por aminoácidos similares tendrá
55 la mismas características de unión en el contexto de un alelo diferente de clase II y presenta el inconveniente adicional que solo pueden crearse «virtualmente» moléculas de MHC de clase II que contengan bolsillos que se encuentran dentro de la biblioteca de bolsillos. Utilizando la estrategia de modelado descrita en el presente

documento, puede deducirse la estructura de moléculas de MHC de clase II y, por tanto, pueden seleccionarse específicamente alelos que sean representativos de la población global. Asimismo, el número de moléculas de MHC de clase II exploradas puede aumentarse preparando otros modelos más que teniendo que generar datos adicionales mediante experimentación compleja.

5 El uso de una biblioteca de cadenas principales tiene en cuenta la variación en las posiciones de los átomos $C\alpha$ de los distintos péptidos que se exploran cuando están acoplados a determinadas moléculas de MHC de clase II. De nuevo, esto contrasta con los métodos por ordenador alternativos anteriores descritos previamente que se basan en el uso de cadenas principales peptídicas simplificadas para explorar la unión de aminoácidos a determinados bolsillos. No es probable que estas cadenas principales simplificadas sean representativas de las conformaciones de
10 cadena principal encontradas en péptidos «reales», lo que induce a imprecisiones en la predicción de la unión peptídica. La actual biblioteca de cadenas principales se crea superponiendo las cadenas principales de todos los péptidos unidos a moléculas de MHC de clase II encontradas en la Base de Datos de Proteínas y anotando la desviación estándar (DE) entre los átomos $C\alpha$ de cada uno de los once aminoácidos localizados dentro del surco de unión. Mientras que esta biblioteca puede derivarse de un pequeño número de estructuras humanas y de ratón disponibles (actualmente 13), para tener en cuenta la posibilidad de una variabilidad incluso mayor, se aumenta un 50% el valor de la media cuadrática para cada posición $C\alpha$. A continuación, se determina la posición media de $C\alpha$ para cada aminoácido y alrededor de este punto se dibuja una esfera cuyo radio equivale a la desviación estándar en esta posición más el 50 %. Esta esfera representa todas las posiciones de $C\alpha$ permitidas.

Trabajando a partir del $C\alpha$ con la mínima desviación estándar (la del aminoácido en el Bolsillo 1, como se ha mencionado previamente, equivalente a la Posición 2 de los 11 restos del surco de unión), la esfera se divide en una cuadrícula tridimensional y entonces cada vértice de la cuadrícula se utiliza como localización posible para un $C\alpha$ de ese aminoácido. El plano amida posterior, que corresponde al enlace peptídico al siguiente aminoácido, se inserta a cada uno de estos $C\alpha$ y los ángulos ϕ y ψ se rotan gradualmente a intervalos fijos para colocar el siguiente $C\alpha$. Si el siguiente $C\alpha$ entra dentro de la «esfera de posiciones permitidas» para este $C\alpha$, entonces se acepta la orientación del dipéptido, mientras que si cae fuera de la esfera, se rechaza el dipéptido. A continuación, este proceso se repite para cada una de las posiciones de $C\alpha$ siguientes, de modo que el péptido crece desde la «semilla» del $C\alpha$ del Bolsillo 1, hasta que se hayan colocado los nueve $C\alpha$ siguientes a partir de todas las posibles permutaciones de los $C\alpha$ precedentes. Finalmente, este proceso se repite una vez más para el único $C\alpha$ que precede al bolsillo 1 para crear una biblioteca de posiciones de $C\alpha$ de cadena principal localizada dentro del surco de unión.

30 El número de cadenas principales generadas depende de varios factores: El tamaño de las «esferas de posiciones permitidas»; la finura de la cuadrícula de la «esfera primaria» en la posición del Bolsillo 1; la finura de la rotación gradual de los ángulos ϕ y ψ empleada para colocar los siguientes $C\alpha$. Con este proceso se puede crear una gran biblioteca de cadenas principales. Cuanto más grande sea la biblioteca de cadenas principales, más probable es que se encuentre el encaje óptimo para un determinado péptido dentro del surco de unión de una molécula de MHC de clase II. En tanto en cuanto no todas las cadenas principales serán adecuadas para acoplarse con todos los modelos de moléculas de MHC de clase II debido a choques con aminoácidos de los dominios de unión, se crea para cada alelo un subconjunto de la biblioteca que contiene cadenas principales que pueden acomodarse en ese alelo. El uso de la biblioteca de cadenas principales, junto con los modelos de moléculas de MHC de clase II crea una base de datos exhaustiva que consiste en conformaciones de cadenas laterales para cada aminoácido en cada posición del surco de unión para cada molécula de MHC de clase II acoplada dentro de cada cadena principal permitida. Este conjunto de datos se genera utilizando una función de solapamiento estérico simple donde una molécula de MHC de clase II se acopla a una cadena principal y se inserta una cadena lateral de aminoácido en la posición deseada de la cadena principal. Cada uno de los enlaces rotables de la cadena lateral se rota gradualmente a intervalos fijos y se anotan las posiciones resultantes de los átomos dependientes de ese enlace. La interacción del átomo con átomos de las cadenas laterales del surco de unión se anota y se aceptan o se rechazan las posiciones según el siguiente criterio: la suma total del solapamiento de todos los átomos ya colocados no debe exceder un valor predeterminado. Por tanto, la rigurosidad de la búsqueda conformacional es una función del intervalo utilizado en la rotación gradual del enlace y el límite predeterminado para el solapamiento total. Este último valor puede ser pequeño si se sabe que un determinado bolsillo es rígido, sin embargo, la rigurosidad puede ser menor si se sabe que las posiciones de las cadenas laterales del bolsillo son relativamente flexibles. Por consiguiente, se pueden efectuar concesiones para imitar las variaciones de flexibilidad dentro de los bolsillos del surco de unión. A continuación, se repite esta búsqueda conformacional para cada aminoácido en todas las posiciones de cada cadena principal cuando está acoplada con cada una de las moléculas de MHC de clase II para crear una base de datos exhaustiva de conformaciones de cadena lateral.

55 Se utiliza una expresión matemática adecuada para estimar la energía de la unión entre los modelos de moléculas de MHC de clase II junto con las conformaciones de ligando peptídico que deben derivarse empíricamente por exploración de la gran base de datos de conformaciones de cadena principal/cadena lateral que se ha descrito previamente. De este modo se explora una proteína para epítopes potenciales de células T sometiendo cada posible péptido de una longitud que varía entre 9 y 20 aminoácidos (aunque la longitud se mantiene constante en cada

exploración) a los siguientes cálculos: Se selecciona una molécula de MHC de clase II junto con una cadena principal peptídica permitida para esa molécula y se insertan las cadenas laterales correspondientes a la secuencia peptídica deseada. Se recopilan los datos de identidad atómica y distancia interatómica relacionados con una determinada cadena lateral en una determinada posición de la cadena principal para cada una de las conformaciones permitidas de ese aminoácido (obtenidas a partir de la base de datos descrita previamente). Esto se repite para cada cadena lateral a lo largo de la cadena principal y se derivan puntuaciones peptídicas utilizando una función de puntuación. Se conserva la mejor puntuación de esa cadena principal y se repite el proceso para cada cadena principal permitida en el modelo seleccionado. Las puntuaciones de todas las cadenas principales permitidas se comparan y la puntuación más elevada se considera la puntuación peptídica para el péptido deseado en ese modelo de MHC de clase II. A continuación, se repite este proceso para cada modelo con todos los posibles péptidos derivados de la proteína que se está explorando y se muestran las puntuaciones para los péptidos frente a los modelos.

En el contexto de la presente invención, cada ligando presentado para el cálculo de la afinidad de unión es un segmento de aminoácidos seleccionado entre un péptido o proteína como se ha descrito previamente. Por consiguiente, el ligando es un tramo seleccionado de aminoácidos de aproximadamente entre 9 y 20 aminoácidos de longitud derivado de un péptido, polipéptido o proteína de secuencia conocida. Los términos «aminoácidos» y «restos» se consideran equivalentes en adelante. El ligando, en la forma de los aminoácidos consecutivos del péptido que se van a examinar insertados en una cadena principal de la biblioteca de cadenas principales, se coloca en la ranura de unión de una molécula de MHC de clase II de la biblioteca de modelos de moléculas de MHC de clase II a través de las coordenadas de los átomos C^α de la cadena principal peptídica y se selecciona una conformación permitida para cada cadena lateral de la base de datos de conformaciones permitidas. Las identidades atómicas y distancias interatómicas relevantes también se recuperan a partir de esta base de datos y se utilizan para calcular la puntuación de unión peptídica. Los ligandos con una elevada afinidad de unión para el bolsillo de unión de MHC de clase II se marcan como candidatos para mutagénesis dirigida a sitio. Se efectúan sustituciones de aminoácidos en el ligando marcado (y, por consiguiente, en la proteína de interés), que se vuelve a analizar a continuación utilizando la función de puntuación para determinar cambios que reduzcan la afinidad de unión por debajo de un valor límite predeterminado. Entonces, estos cambios pueden incorporarse en la proteína de interés para eliminar los epítopes de células T.

La unión entre el ligando peptídico y el surco de unión de las moléculas de MHC de clase II implica interacciones no covalentes incluyendo, entre otras: enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas (lipofílicas) e interacciones de Van der Waals. Estas se incluyen en la función de puntuación peptídica como se describe en detalle más adelante. Debe entenderse que un enlace de hidrógeno es un enlace no covalente que puede formarse entre grupos polares o cargados y consistente en un átomo de hidrógeno compartido por otros dos átomos. El hidrógeno del dador de hidrógeno tiene una carga positiva donde el aceptor de hidrógeno tiene una carga negativa parcial. A efectos de las interacciones péptido/proteína, los dadores de hidrógeno pueden ser nitrógenos con hidrógeno enlazado o hidrógenos enlazados a oxígeno o a nitrógeno. Los átomos aceptores de enlace de hidrógeno pueden ser oxígenos no enlazados a hidrógeno, nitrógenos sin hidrógenos enlazados y una o dos conexiones, o azufres con una sola conexión. Determinados átomos, como oxígenos enlazados a hidrógenos o nitrógenos imina (p. ej. C=NH) pueden ser tanto aceptores como dadores de hidrógeno. Las energías del enlace de hidrógeno varían entre 3 y 7 Kcal/mol y son mucho más fuertes que los enlaces de Van der Waals, pero más débiles que los enlaces covalentes. Los enlaces de hidrógeno también son muy direccionales y tienen el máximo de fuerza cuando el átomo dador, el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor son colineales. Los enlaces electrostáticos se forman entre pares de iones con carga contraria y la fuerza de la interacción es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre los átomos según la ley de Coulomb. La distancia óptima entre los pares de iones es de aproximadamente 2,8 Å. En las interacciones proteína/péptido, los enlaces electrostáticos pueden formarse entre arginina, histidina o lisina y aspartato o glutamato. La fuerza del enlace dependerá del pKa del grupo ionizante y la constante dieléctrica del medio, aunque tienen una fuerza aproximadamente igual a los enlaces de hidrógeno.

Las interacciones lipofílicas son contactos hidrófobo-hidrófobo favorables que se dan entre la proteína y el ligando peptídico. Normalmente, se producen entre cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos del péptido enterradas dentro de los bolsillos del surco de unión de modo que no estén expuestas al solvente. La exposición de los restos hidrófobos al solvente es muy desfavorable ya que las moléculas de solvente circundantes están forzadas a enlazarse entre ellas mediante enlaces de hidrógeno formando estructuras de clatrato en forma de jaula. La reducción de entropía resultante es muy desfavorable. Los átomos lipofílicos pueden ser azufres, que no son ni polares ni aceptores de hidrógeno, y átomos de carbono, que no son polares.

Los enlaces de Van der Waals son fuerzas no específicas que se dan entre átomos que se encuentran a una distancia de 3-4 Å. Son más débiles y menos específicos que los enlaces de hidrógeno y electrostáticos. La distribución de la carga eléctrica alrededor de un átomo varía con el tiempo y, en cualquier instante, la distribución de carga no es simétrica. Esta asimetría transitoria de la carga eléctrica induce una asimetría similar en los átomos vecinos. Las fuerzas de atracción resultantes entre átomos alcanza un máximo a la distancia de contacto de Van der Waals pero disminuye muy rápido a partir de aproximadamente 1 Å hasta unos 2 Å. A la inversa, a medida que los

átomos se separan menos que la distancia de contacto, las fuerzas de repulsión cada vez más fuertes se vuelven dominantes a medida que las nubes de electrones exteriores de los átomos se solapan. Aunque las fuerzas de atracción son relativamente débiles en comparación con los enlaces de hidrógeno y electrostáticos (aproximadamente 0,6 Kcal/mol), las fuerzas de repulsión en particular pueden ser muy importantes para determinar si el ligando peptídico puede unirse con éxito a la proteína.

En una realización, se utiliza la función de puntuación de Böhm (técnica SCORE1) para estimar la constante de unión (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 8(3):243-256 (1994)). En otra realización, se utiliza la función de puntuación (técnica SCORE2) para estimar las afinidades de unión como un indicador de un ligando que contiene un epítipo de células T (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 12(4):309-323 (1998)). Sin embargo, las funciones de puntuación de Böhm descritas en las referencias anteriores se utilizan para estimar la afinidad de unión de un ligando a una proteína donde ya se sabe que el ligando se une con éxito a la proteína y ya se ha resuelto la estructura del complejo proteína/ligando, estando presente la estructura resuelta en la Base de Datos de Proteínas («PDB»). Por tanto, la función de puntuación se ha desarrollado con la ventaja de conocer datos de unión positivos. Para tener en cuenta la discriminación entre ligandos positivos y negativos, se debe añadir un término de repulsión a la ecuación. Además, se consigue una estimación más satisfactoria de la energía de unión computando las interacciones lipofílicas por pares que utilizando el término de energía basado en el área de las anteriores funciones de Böhm. Por tanto, en una realización preferida, se estima la energía de unión utilizando una función de puntuación de Böhm modificada. En la función de puntuación de Böhm modificada, se estima la energía de unión entre proteína y ligando ($\Delta G_{\text{unión}}$) teniendo en cuenta los siguientes parámetros: La reducción de la energía de unión debida a la pérdida global de entropía de translación y rotación del ligando (ΔG_0); contribuciones de enlaces de hidrógeno ideales (ΔG_{eh}) donde al menos una pareja es neutra; contribuciones de interacciones iónicas no perturbadas ($\Delta G_{\text{iónica}}$); interacciones lipofílicas entre átomos de ligando lipofílicos y átomos aceptores lipofílicos (ΔG_{lipo}); la pérdida de energía de enlace debido a la congelación de grados de libertad internos en el ligando, es decir, se reduce la libertad de rotación de cada enlace C-C (ΔG_{rot}); la energía de la interacción entre la proteína y el ligando (E_{vdw}). La consideración de estos términos da la ecuación 1:

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

Donde N es el número de interacciones que cuentan para un término específico, en una realización, ΔG_0 , ΔG_{eh} , $\Delta G_{\text{iónica}}$, ΔG_{lipo} y ΔG_{rot} son constantes a las que se les da los valores: 5,4; -4,7; -4,7; -0,17 y 1,4, respectivamente.

El término N_{eh} se calcula según la ecuación 2:

$$N_{\text{eh}} = \sum_{\text{enlaces-h}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \times f(N_{\text{vecinos}}) \times f_{\text{scp}}$$

$f(\Delta R, \Delta \alpha)$ es una función de penalización que tiene en cuenta las grandes desviaciones de los enlaces de hidrógeno de la idealidad y se calcula según la ecuación 3:

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

Donde: $f_1(\Delta R) = 1$ si $\Delta R \leq \text{TOL}$

$$o = 1 - (\Delta R - \text{TOL})/0,4 \text{ si } \Delta R \leq 0,4 + \text{TOL}$$

$$o = 0 \text{ si } \Delta R > 0,4 + \text{TOL}$$

Y: $f_2(\Delta \alpha) = 1$ si $\Delta \alpha < 30^\circ$

$$o = 1 - (\Delta \alpha - 30)/50 \text{ si } \Delta \alpha \leq 80^\circ$$

$$o = 0 \text{ si } \Delta \alpha > 80^\circ$$

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

ΔR es la desviación de la longitud del enlace de hidrógeno H-O/N del valor ideal = 1,9 Å

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

$f(N_{\text{vecino}})$ distingue entre partes cóncavas y convexas de la superficie de una proteína y, por tanto, asigna un peso mayor a las interacciones polares que se encuentran en los bolsillos que a las que se encuentran en la superficie de la proteína. Esta función se calcula según la ecuación 4 que sigue:

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

- 5 N_{vecino} es el número de átomos de proteína que no son hidrógeno que están a menos de 5 Å de distancia de cualquier átomo de proteína.

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

F_{scp} es una función que tiene en cuenta el área de superficie de contacto polar por enlace de hidrógeno y, por tanto, distingue entre enlaces de hidrógeno fuertes y débiles y su valor se determina según los siguientes criterios:

10 $F_{\text{scp}} = \beta$ cuando $A_{\text{polar}}/N_{\text{eh}} < 10 \text{ \AA}^2$

o $f_{\text{scp}} = 1$ cuando $A_{\text{polar}}/N_{\text{eh}} > 10 \text{ \AA}^2$

A_{polar} es el tamaño de la superficie de contacto polar proteína-ligando

N_{eh} es el número de enlaces de hidrógeno

β es una constante cuyo valor = 1,2

- 15 Para la implementación de la función de puntuación de Böhm modificada, se computan las contribuciones de las interacciones iónicas, $\Delta G_{\text{iónica}}$, de una forma similar a las de los enlaces de hidrógeno descrita previamente puesto que se supone la misma dependencia de la geometría.

El término N_{lipo} se calcula según la ecuación 5 que sigue:

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

- 20 $f(r_{iL})$ se calcula para todos los átomos de ligando lipofílicos, I, y todos los átomos de proteína lipofílicos, L, según los siguientes criterios:

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

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

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

- 25 y $R2 = R1 + 3,0$

y r_1^{vdw} es el radio de Van der Waals del átomo I

y r_L^{vdw} es el radio de Van der Waals del átomo L

El término N_{rot} es el número de enlaces rotables de la cadena lateral de aminoácidos y se estima que es el número de enlaces $sp^3 - sp^3$ y $sp^3 - sp^2$ acíclicos. No se tienen en cuenta las rotaciones de $-CH_3$ ni $-NH_3$ terminales.

- 30 El término final, E_{vdw} , se calcula según la ecuación 6 que sigue:

$$E_{\text{vdw}} = \varepsilon_1 \varepsilon_2 ((r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}})^{12} / r^{12} - (r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}})^6 / r^6), \text{ donde:}$$

ε_1 y ε_2 son constantes que dependen de la identidad atómica

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

r es la distancia entre un par de átomos.

Con respecto a la ecuación 6, en una realización, se dan a las constantes ϵ_1 y ϵ_2 los valores atómicos: C: 0,245, N: 0,283, O: 0,316, S: 0,316, respectivamente (es decir, para átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, respectivamente). Con respecto a las ecuaciones 5 y 6, se da a los radios de Van der Waals los valores atómicos: C: 1,85, N: 1,75, O: 1,60, S: 2,00 Å.

5 Debe entenderse que todos los valores y constantes predeterminados dados en las anteriores ecuaciones se determinan dentro de los límites de los conocimientos actuales de las interacciones ligando proteína, en particular, con respecto al tipo de cálculos por ordenador que se realizan en este documento. Por tanto, es posible que, a medida que esta función de puntuación se vaya refinando, estos valores y constantes varíen, por lo que se puede utilizar cualquier valor numérico adecuado que dé los resultados deseados en términos de estimación de la energía de unión de una proteína a un ligando y, por tanto, entre dentro del alcance de la presente invención. Como se ha descrito previamente, la función de puntuación se aplica a datos extraídos de la base de datos de conformaciones de cadenas laterales, identidades atómicas y distancias interatómicas. A efectos de la presente descripción, el número de moléculas de MHC de clase II incluidas en esta base de datos es de 42 modelos más cuatro estructuras resueltas. A partir de las descripciones anteriores, debería estar claro que la naturaleza modular de la construcción del método por ordenador de la presente invención significa que los nuevos modelos pueden simplemente añadirse y explorarse con la biblioteca de péptidos y la función de búsqueda conformacional de cadenas laterales para crear conjuntos de datos adicionales que puedan procesarse mediante la función de puntuación peptídica como se ha descrito previamente. Esto permite incrementar fácilmente el repertorio de moléculas de MHC de clase II exploradas o sustituir estructuras y datos asociados si se cuenta con datos para crear modelos más precisos de los alelos existentes.

El presente método de predicción puede calibrarse con respecto a un conjunto de datos que consta de un gran número de péptidos cuya afinidad por distintas moléculas de MHC de clase II se ha determinado experimentalmente con anterioridad. Por comparación de datos calculados frente a datos experimentales, se puede determinar un valor de corte por encima del cual se sabe que todos los epítopes de células T determinados experimentalmente se predicen con exactitud.

Debe entenderse que, aunque la anterior función de puntuación sea relativamente sencilla en comparación con algunas metodologías sofisticadas disponibles, los cálculos se realizan extremadamente rápido. También debe entenderse que el objetivo no es calcular la energía de unión real *per se* para cada péptido acoplado en el surco de unión de una proteína de MHC de clase II seleccionada. El objetivo esencial es obtener datos de energía de unión comparativos para ayudar a predecir la localización de epítopes de células T con base en la estructura primaria (es decir, la secuencia de aminoácidos) de una proteína seleccionada. Una energía de unión relativamente elevada o una energía de unión por encima del valor límite seleccionado sugeriría la presencia de un epítope de células T en el ligando. Entonces, el ligando puede someterse a al menos una ronda de sustitución de aminoácido y recalcularse la energía de unión. Debido a la rapidez de los cálculos, estas manipulaciones de la secuencia peptídica pueden realizarse interactivamente en la interfaz de usuario del programa en un hardware informático disponible de forma económica. Por consiguiente, no se requiere una gran inversión en hardware informático.

Para los expertos en la materia, está claro que se podría utilizar otro software disponible para los mismos propósitos. En particular, puede utilizarse software más sofisticado que sea capaz de acoplar ligandos en sitios de unión de proteínas conjuntamente con minimización de energía. Ejemplos de software de acoplamiento son: DOCK (Kuntz y col., *J. Mol. Biol.*, 161:269-288 (1982)), LUDI (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 8:623-632 (1994)) y FLEXX (Rarey M., y col., *ISMB*, 3:300-308 (1995)). Ejemplos de software de modelado y manipulación molecular incluyen: AMBER (Tripos) y CHARMM (Molecular Simulations Inc.). El uso de estos métodos por ordenador limitarían sobremanera el rendimiento del método de esta invención debido a la duración del tiempo de procesamiento requerido para efectuar los cálculos necesarios. Sin embargo, es factible que tales métodos pudieran utilizarse como un «cribado secundario» para obtener cálculos más exactos de energía de unión para péptidos que resultan ser «ligandos positivos» mediante el método de la presente invención. La limitación del tiempo de procesamiento para cálculos de dinámica molecular o mecánica molecular se define tanto por el diseño del software que efectúa estos cálculos como las limitaciones tecnológicas actuales de hardware informático. Puede esperarse que, en el futuro, con la escritura de un código más eficiente y el continuo aumento de velocidad de los procesadores informáticos, pueda llegar a ser factible realizar tales cálculos dentro de un espacio de tiempo más razonable. Se puede encontrar más información acerca de las funciones de energía aplicadas a macromoléculas y la consideración de distintas interacciones que se producen dentro de una estructura proteica plegada en: Brooks, B.R., y col., *J. Comput. Chem.*, 4:187-217 (1983) y se puede encontrar más información relativa a las interacciones generales proteína-ligando en: Dauber-Osguthorpe y col., *Proteins* 4(1):31-47(1988). También puede encontrarse información básica útil en, por ejemplo, Fasman, G.D., ed., *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Plenum Press, Nueva York, ISBN: 0-306 4313-9.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo modificado o fragmento del mismo seleccionado del grupo formado por fragmentos Fab', F(ab')₂, Fv y Fc, dianticuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo dirigido(s) frente al receptor EGF (Her 1) que deriva del anticuerpo 425 murino y presenta –en comparación con el anticuerpo original no modificado inmunogénicamente– un número reducido de epítopes de células T, los cuales son ligandos de MHC de clase II o secuencias peptídicas que muestran la capacidad de estimular o unirse a células T a través de presentación en clase II, por tanto, siendo sustancialmente no inmunogénicos o menos inmunogénicos que cualquier anticuerpo original inmunogénicamente no modificado dirigido frente al mismo receptor cuando se expone al sistema inmunitario de una determinada especie, donde dicho anticuerpo modificado presenta las secuencias VH y VK seleccionadas del grupo formado por:

VH1:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGP EWAGEFNPSNGR TNYNEKFKSR
VTITVDKSTSTAYMQLSSLTSED TAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK1:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSPRL LIYDASN LASGVPARFSGSGSG
TSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH2:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGP EWIGEFNPSNGR TNYNEKFKSR
VTITVDKSTSTAYMQLSSLTSED TAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK2:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSPRAL IYDTSN LASGVPARFSGSGSG
TSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH3:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFNPSNGR TNYN
EKFKSRVTITVDKSTSTAYMQLSSLTSED TAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK3:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSPRL LIYDTSN LASGVPARF
SGSGSGTSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH4:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFNPSNGR TNYN
EKFKSRATLTVDKSTSTAYMQLSSLTSED TAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK4:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSPRL LIYDTSN LASGVPARF
SGSGSGTSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH5:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAAGQGLEWIGEFNPSNGR TNYN
EKFKSRATLTVDKSTSTAYMQLSSLTSED TAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK5:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWYQQKPGQSPRLLIYDTSNLAGVPARF

SGSGSGTSTYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHI FTFGQGTKVEIK.

2. Un anticuerpo modificado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo original no modificado inmunogénicamente es un anticuerpo quimérico.
- 5 3. Un anticuerpo modificado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo original no modificado inmunogénicamente es un anticuerpo no humano que incluye restos superficiales excepto aquellos que no se encuentran cerca de las regiones CDR, que derivan de las correspondientes secuencias estructurales humanas (anticuerpo chapado).
4. Un anticuerpo modificado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo original no modificado inmunogénicamente es AcM 425 murino.
- 10 5. Una secuencia de ADN que codifica para la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo modificado según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4.
6. Una composición farmacéutica que incluya un anticuerpo anti-EGFR modificado como se ha definido previamente en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, opcionalmente junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 7. Una composición farmacéutica de la reivindicación 6 que contenga, además, una cantidad farmacológicamente eficaz de un fármaco citotóxico.
8. Un método para fabricar un anticuerpo anti-EGFR (HER-1) modificado que deriva del AcM 425 murino y presenta –en comparación con el anticuerpo original no modificado inmunogénicamente– un número reducido de epítopes de células T, los cuales son ligandos de MHC de clase II o secuencias peptídicas que muestran la capacidad de estimular o unirse a células T a través de presentación en clase II, por tanto, siendo sustancialmente no inmunogénicos o menos inmunogénicos que cualquier anticuerpo original no modificado inmunogénicamente dirigido frente al mismo receptor cuando se expone al sistema inmunitario de una determinada especie, que consta de las etapas:
 - 20 (i) determinación de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo original no modificado inmunogénicamente o parte del mismo.
 - 25 (ii) identificación de uno o más epítopes potenciales de células T en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mediante cualquier método que incluya la determinación de la unión de los péptidos a las moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos; dicha identificación se lleva a cabo mediante las siguientes etapas:
 - 30 (a) selección de una región del péptido que tenga una secuencia de restos de aminoácidos conocida;
 - (b) fragmentación secuencial de segmentos de restos de aminoácidos solapados de tamaño uniforme predeterminado y constituidos por al menos tres restos de aminoácidos de la región seleccionada; (c) cálculo de la puntuación de unión a la molécula de MHC de clase II para cada uno de dichos segmentos fragmentados sumando los valores asignados para cada cadena lateral de resto de aminoácidos hidrófoba presente en dicho segmento de resto de aminoácidos fragmentado;
 - 35 dicha etapa incluye el empleo de una función de puntuación de Böhm modificada para incluir el término 12-6 de energía de repulsión ligando-proteína de Van der Waals y el término de energía conformacional del ligando mediante
 - 40 (1) la provisión de una primera base de datos de cadenas principales peptídicas permitidas para dichos modelos de moléculas de MHC de clase II,
 - (2) la provisión de una segunda base de datos de cadenas principales peptídicas permitidas para dichos modelos de moléculas de MHC de clase II;
 - (3) la selección de un modelo de dicha primera base de datos;

- (4) la selección de una cadena principal peptídica permitida a partir de dicha segunda base de datos;
- (5) la identificación de cadenas laterales de restos de aminoácidos presentes en cada segmento fragmentado;
- 5 (6) la determinación del valor de afinidad de unión para todas las cadenas laterales presentes en cada segmento fragmentado, y la repetición de las etapas de la (1) a la (5) para cada uno de dichos modelos y cada una de dichas cadenas principales, y
- (d) identificación de al menos uno de dichos segmentos como adecuado para modificación, en base a la puntuación de unión a molécula de MHC de clase II calculada para ese segmento, para cambiar la puntuación global de unión a molécula de MHC de clase II para el péptido sin reducir sustancialmente la utilidad terapéutica del péptido
- 10 (iii) el diseño de nuevas variantes de secuencia con uno o más aminoácidos dentro de los epítopes potenciales de células T identificados modificados de modo que se reduzca sustancialmente o se elimine la actividad del epítope de células T, según se determinó mediante la unión de los péptidos a moléculas de MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico*, o ensayos biológicos, o mediante la unión de complejos péptido-MHC a células T; dicha modificación de epítopes de células T se lleva a cabo mediante la sustitución de 1 a 9 restos de aminoácidos en cualquier epítope de células T presente en un principio;
- 15 (iv) la construcción de estas variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y el análisis de dichas variantes para identificar una o más variantes con las propiedades deseables; y
- (v) la repetición opcional de las etapas de la (ii) a la (iv).
- 20 **9.** El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo anti-EGFR original no modificado inmunogénicamente es un anticuerpo quimérico.
- 10.** El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo original no modificado inmunogénicamente es un anticuerpo no humano que incluye restos superficiales excepto aquellos que no se encuentran cerca de las regiones CDR, que derivan de las correspondientes secuencias estructurales humanas (anticuerpo chapado).
- 25 **11.** Un método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo anti-EGFR original no modificado inmunogénicamente es el AcM 425 murino.
- 12.** Un método de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 11, en el que dicho anti-EGFR presenta secuencias VH y VK seleccionadas del grupo formado por:

VH1:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGP EWAGEFNPSNGRTNYNEKFKSR
VTITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDTAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK1:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSP RLLIYDASNLASGVPARFSGSGSG
TSYTLTIS SLEAEDAATYYCQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH2:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGP EWIGEFNPSNGRTNYNEKFKSR
VTITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDTAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK2:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSP RALIYDTSNLAGSVPARFSGSGSG
TSYTLTIS SLEAEDAATYYCQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH3:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGL EWIGEFNPSNGRTNYN
EKFKSRVTITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDTAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK3:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSP RLLIYDTSNLAGSVPARF
SGSGSGTSYTLTIS SLEAEDAATYYCQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH4:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGL EWIGEFNPSNGRTNYN
EKFKSRATLTVDKSTSTAYMQLSSLTSEDTAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK4:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSP RLLIYDTSNLAGSVPARF
SGSGSGTSYTLTIS SLEAEDAATYYCQWSSHPFTFGQGTKVEIK

VH5:

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAAGQGL EWIGEFNPSNGRTNYN
EKFKSRATLTVDKSTSTAYMQLSSLTSEDTAVYYCASRDYDYG RYFDYWGQGTTLTVSS

VK5:

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWYQKPGQSP RLLIYDTSNLAGSVPARF
SGSGSGTSYTLTIS SLEAEDAATYYCQWSSHPFTFGQGTKVEIK.