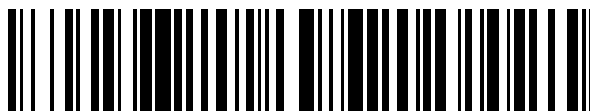


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 862**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2011** **PCT/EP2011/070911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012** **WO12069575**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2011** **E 11788142 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2643347**

54 Título: **Modulación de inmunogenicidad de antígeno mediante la eliminación de epítomos reconocidos por linfocitos NKT**

30 Prioridad:

25.11.2010 EP 10192568

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2018

73 Titular/es:

IMNATE SARL (100.0%)
80 Rue des Romains
8041 Strassen, LU

72 Inventor/es:

SAINT-REMY, JEAN-MARIE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 663 862 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

Modulación de inmunogenicidad de antígeno mediante la eliminación de epítomos reconocidos por linfocitos NKT

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a péptidos o polipéptidos para disminuir la inmunogenicidad natural o inducir tolerancia y a su uso en la prevención de respuestas inmunitarias provocadas frente a alofactores, frente a vectores víricos usados para la terapia génica o la vacunación génica, frente a antígenos ambientales usados en alimentos o piensos o a los que se exponen los sujetos por inhalación o contacto, o para disminuir los efectos secundarios asociados con la vacunación por alérgenos o agentes infecciosos.

Antecedentes de la invención

En muchos casos, la administración de proteínas con fines terapéuticos da como resultado una respuesta inmunitaria contra los agentes terapéuticos, lo que impide cualquier administración posterior de dicho agente terapéutico. Se proporcionan ejemplos de esto mediante la administración del factor VIII de la ruta de la coagulación en sujetos afectados por la hemofilia A: aproximadamente un tercio de los sujetos tratados producen anticuerpos anti-factor VIII que inhiben la función del factor VIII. La administración de enzimas tales como alfa-galactosidasa a sujetos que padecen deficiencia en el metabolismo del glucógeno es seguida también por una respuesta inmunitaria contra el agente terapéutico que excluye cualquier administración posterior. Un tercer ejemplo lo proporcionan anticuerpos usados como agentes terapéuticos y dirigidos hacia la molécula de superficie de linfocitos, citocinas o receptores de citocina. En general, es muy deseable encontrar nuevos enfoques terapéuticos que prevengan la inmunización contra agentes terapéuticos.

El uso de vectores víricos para la terapia génica o la vacunación génica está severamente restringido por el hecho de que dichos vectores víricos provocan una respuesta inmunitaria que da como resultado la eliminación rápida de las células transducidas por el vector y la pérdida rápida de la expresión transgénica. Los vectores víricos provocan la activación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa con un grado variable de intensidad dependiendo de la naturaleza del vector vírico. Por tanto, los vectores de adenovirus estimulan fuertemente la respuesta inmunitaria innata seguida de una respuesta inmunitaria adaptativa. Los vectores víricos adenoasociados desencadenan una respuesta innata más débil pero provocan la producción de anticuerpos. El potencial tanto de terapia génica como de vacunación génica es enorme. Un enfoque terapéutico mediante la respuesta innata y/o adaptativa frente a vectores víricos representaría un progreso altamente significativo en el campo. Muchos sujetos padecen una respuesta provocada contra las proteínas a las que están expuestos de forma natural. Los alérgenos, ya sea en el aire o de los alimentos, provocan reacciones como rinitis alérgica y asma, urticaria, eccema y reacción anafiláctica. La razón de por qué dichos sujetos presentan tales reacciones está solo parcialmente dilucidada. Sería muy beneficioso reducir la inmunogenicidad natural de proteínas tan diversas como los alérgenos alimentarios, el trigo que causa la enfermedad celíaca o productos tales como las enzimas a las que los sujetos están expuestos por razones profesionales.

En estrategias de vacunación para enfermedades alérgicas o contra agentes infecciosos, la eficacia terapéutica a menudo está limitada por los efectos secundarios que son provocados por las propiedades proinflamatorias de alérgenos o agentes infecciosos. Tales efectos inflamatorios impiden el uso de dosis más altas de vacunas y, por lo tanto, de eficacia de la vacuna, y orientan la respuesta inmunitaria hacia respuestas celulares no deseadas, tales como reacciones de tipo retardado y producción de anticuerpos de un isotipo que no es óptimo para la afección considerada. Un mejor control de la inflamación en la vacunación ofrecería una modulación mucho más eficaz de la respuesta inmunitaria a la vez que reduciría los efectos secundarios relacionados con la inflamación.

Los linfocitos T citolíticos naturales (NKT) constituyen un linaje distinto de linfocitos T no convencionales que reconocen los antígenos presentados por la molécula del complejo MHC no clásica CD1d. Dos subconjuntos de linfocitos NKT se describen actualmente. Los linfocitos NKT de tipo 1, también llamados linfocitos NKT invariantes (iNKT), son los más abundantes. Se caracterizan por la presencia de un receptor de linfocitos T alfa-beta (TCR) formado por una cadena alfa invariante, Valpha14 en el ratón y Valpha24 en seres humanos. Esta cadena alfa está asociada a un número variable aunque de cadenas beta. Los linfocitos NKT de tipo 2 tienen un TCR alfa-beta pero con una cadena alfa polimórfica. Sin embargo, es evidente que existen otros subconjuntos de linfocitos NKT, cuyo fenotipo aún está incompletamente definido, pero que comparten las características de ser activados por glicolípidos presentados en el contexto de la molécula CD1d.

Los linfocitos NKT típicamente expresan una combinación de receptor de linfocitos citolíticos naturales (NK), incluyendo NKG2D y NK1.1. Los linfocitos NKT son parte del sistema inmunitario innato, que se puede distinguir del sistema inmunitario adaptativo por el hecho de que no requieren expansión antes de adquirir capacidad eferente completa. La activación de los linfocitos NKT da como resultado diversos efectos. Tales células liberan mediadores preformados, que incluyen una gran variedad de citocinas (incluyendo interleucina (IL)-4, interferón (IFN)-gamma, IL-21 e IFN-alfa) que proporcionan ayuda a los linfocitos B para la producción de anticuerpos, y se ha sugerido que la liberación de citocinas también podría influir en los linfocitos T CD4+ (Burrows *et al.* Nature Immunology 2009, 10:

669-671). En el contexto de la presente invención, se considera que la prevención tanto de la activación de linfocitos B como de la activación de linfocitos T CD4+ restringidos a la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) juega un papel en la reducción o anulación de la inmunogenicidad de las proteínas.

5 La unidad de reconocimiento para linfocitos, la molécula CD1d, tiene una estructura que se parece mucho a la de la molécula del MHC de clase I, incluida la presencia de microglobulina beta-2. Se caracteriza por una hendidura profunda, rodeada por dos cadenas alfa y que contiene residuos altamente hidrófobos, que acepta cadenas lipídicas. La hendidura está abierta en ambos extremos, lo que permite acomodar cadenas más largas. El ligando canónico para CD1d es la alfa galactosilceramida sintética (alfa GalCer). Sin embargo, se han descrito muchos ligandos
10 alternativos naturales, que incluyen glico- y fosfolípidos, el lípido natural sulfatida que se encuentra en la mielina, manósido de fosfoinositol microbiano y alfa-glucuronosilceramida. El consenso actual (véanse reseñas, como Matsuda *et al.*, Current Opinion in Immunology 2008, 20: 358-368 y Godfrey *et al.*, Nature reviews Immunology 2010, 11: 197-206) es que la CD1d se une únicamente a ligandos que contienen cadenas lipídicas, o en general una estructura común formada por una cola lipídica que se entierra en la CD1d y un grupo de cabeza de residuo de
15 azúcar que sobresale de la CD1d.

No se considera que los péptidos puedan activar los linfocitos NKT a través de la presentación por CD1d. Sin embargo, se sugirió que los péptidos hidrófobos largos que contienen residuos de aminoácidos voluminosos podrían unirse a CD1d (Castano *et al.*, Science 1995, 269: 223-226). Las observaciones llevadas a cabo utilizando
20 colecciones de presentación en fagos que expresan péptidos de secuencia aleatoria sin relevancia fisiológica definida permitieron establecer un motivo teórico de consenso (Castano *et al.*, Science 1995, 269: 223-226 y véase a continuación).

De hecho, Castano *et al.* muestran que las células que se activan son linfocitos T CD8+, a saber, células restringidas a MHC de clase I, y no linfocitos NKT. Estos hallazgos enseñan a los expertos en la técnica que no hay evidencia de
25 que los péptidos hidrófobos sean presentados por moléculas CD1d. La relevancia fisiológica de las afirmaciones hechas por Castano *et al.* se cuestionó aún más debido a la incapacidad de obtener provocar linfocitos NKT bajo protocolos de inmunización convencionales (Matsuda *et al.*, Current Opinion in Immunology 2008, 20: 358-368 y Brutkiewicz Journal of Immunology 2006, 177: 769-775). Los sistemas artificiales tales como la inmunización con
30 células transfectadas para sobreexpresar CD1d y cargadas in vitro con un péptido derivado de ovoalbúmina pudieron provocar linfocitos NKT. Asimismo, la inmunización intradérmica con ADN plasmídico junto con CD1d de murino y moléculas coestimuladoras inducen linfocitos T citolíticos restringidos a CD1d (Lee *et al.*, Journal of Experimental Medicine 1998, 187: 433-438). Se afirmó que los péptidos hidrófobos que contienen un motivo estructural formado por un residuo aromático en la posición P1 y P7, y una cadena alifática en la posición P4, Castano *et al.* (Science
35 269: 223, 1995), contienen un motivo central para epítopos de unión a CD1d. Como se describe anteriormente, las conclusiones alcanzadas por Castano *et al.* no están respaldadas por datos.

Swaroop M *et al.* "Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII", J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, pág. 24121-24124, divulga la mutación F309S en el factor VIII para aumentar su secreción. Sin embargo, esta publicación no divulga ningún efecto sobre la activación de linfocitos
40 NKT.

Se hizo el descubrimiento inesperado de que péptidos que abarcan una secuencia de aminoácidos hidrófoba son de hecho capaces de provocar la activación de linfocitos NKT.
45

Si los epítopos de proteínas administradas con fines terapéuticos, o a las que normalmente están expuestos los sujetos, o cuando se lleva a cabo terapia génica o vacunación génica, o se administran en el contexto de vacunación para enfermedades alérgicas o infecciosas, se unen a CD1d y activan así linfocitos NKT, entonces la alteración de dichas proteínas mediante mutaciones y/o deleciones para eliminar dichos epítopos sería altamente deseable para
50 prevenir la inmunogenicidad.

La identificación de tales epítopos seguida de mutación, adición o delección de aminoácidos para prevenir la activación de linfocitos NKT forma la base de la presente invención.

55 Sumario de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones y se divulga en la presente memoria el uso de péptidos o polipéptidos para el tratamiento de respuestas inmunitarias provocadas frente a un alofactor, que es el Factor VIII, en un sujeto al prevenir dicha respuesta inmunitaria frente a dicho alofactor. Se divulga en la presente
60 memoria el uso de péptidos o polipéptidos para el tratamiento de respuestas inmunitarias provocadas frente a vectores víricos usados para la terapia génica o la vacunación génica en un sujeto mediante la prevención de dicha respuesta inmunitaria frente a dichos vectores víricos. Se divulga en la presente memoria el uso de péptidos o polipéptidos preparados por organismos genéticamente modificados para la prevención en un sujeto de respuestas inmunitarias provocadas por la exposición a proteínas naturales. Se describe en la presente memoria el uso de
65 péptidos o polipéptidos con fines de vacunación cuando la activación de la inmunidad innata es perjudicial.

La presente invención también se refiere a métodos para identificar proteínas que portan epítomos de unión a CD1d y para eliminar tales epítomos por sustitución o delección de aminoácidos.

Se hizo el descubrimiento inesperado de que una proporción significativa de péptidos o polipéptidos portaban secuencias de aminoácidos que les permitían unirse y presentarse por los determinantes de CD1d para la activación de linfocitos T citolíticos naturales (NKT). La activación de tales células da como resultado la liberación de citocinas y, en algunos casos, la adquisición o el aumento de las propiedades citolíticas.

La presente invención se refiere en un aspecto a la SEQ.ID.NO:4, un polipéptido usado como alofactor, el Factor VIII, que se ha modificado para eliminar al menos dos residuos de aminoácidos hidrófobos implicados en la formación de un epítomo reconocido por linfocitos NKT. Se describe en la presente memoria el uso de al menos un péptido o polipéptido aislado usado como vector vírico para terapia génica o vacunación génica, que se ha modificado para eliminar al menos un residuo de aminoácido hidrófobo implicado en la formación de un epítomo reconocido por linfocitos NKT, como medicamento para prevenir en un sujeto respuestas inmunitarias frente a dichos vectores víricos. Se describe en la presente memoria el uso de al menos un péptido o polipéptido aislado producido por un organismo genéticamente modificado, estando dicho péptido o polipéptido modificado para eliminar al menos un residuo de aminoácido hidrófobo implicado en la formación de un epítomo reconocido por linfocitos NKT, como medicamento para prevenir en un sujeto respuestas inmunitarias frente a la exposición natural a dichos péptidos o polipéptidos. Se describe en la presente memoria el uso de al menos un péptido o polipéptido aislado usado como vacuna, que se ha modificado para eliminar al menos un residuo de aminoácido hidrófobo implicado en la formación de un epítomo reconocido por linfocitos NKT, como medicamento para prevenir en un sujeto una respuesta inmunitaria no deseada o inapropiada frente a dicha vacuna. Se describe en la presente memoria el uso de al menos un péptido o polipéptido aislado usado como alofactor, un vector vírico, un organismo genéticamente modificado o una vacuna, que se ha modificado para eliminar al menos un residuo de aminoácido hidrófobo implicado en la formación de un epítomo reconocido por linfocitos NKT, como medicamento para prevenir en un sujeto la activación, la producción de citocinas, la actividad citolítica y la actividad supresora sobre las respuestas inmunitarias adaptativas portadas por los linfocitos NKT CD4+ en dicho sujeto. Se describen en la presente memoria péptidos o polipéptidos hidrófobos que abarcan al menos un epítomo de linfocitos T restringido a CD1d, en el que los aminoácidos dispuestos como residuos de anclaje a CD1d se reemplazan por aminoácidos alternativos o se eliminan, lo que da como resultado una pérdida o reducción significativa de la unión a CD1d y de la activación de linfocitos NKT.

La estructura de la molécula CD1d indica que se requieren residuos de aminoácidos hidrófobos para ocupar los dos bolsillos hidrófobos localizados en los extremos de la hendidura de CD1d y que un residuo alifático debe ocupar la posición en el medio de la hendidura. Por lo tanto, como un ejemplo general de secuencia de unión a CD1d, se puede usar el motivo [FW]-xx-[ILM]-xx-[FWTH], en el que [FW] indica que F o W pueden ocupar el primer residuo de anclaje (PI), que la posición P4 puede ser ocupada por I, L o M y que P7 puede estar ocupada por F, W, T o H. x en este motivo de modelo general representa cualquier aminoácido. Debe quedar claro para un experto en la materia que son posibles diversas combinaciones de estos residuos de aminoácidos. En una realización particular, el motivo de modelo general puede presentarse como una secuencia invertida tal como [FWTH]-xx-[ILM]-xx-[FW]. Se describen en la presente memoria péptidos o polipéptidos en los que F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7 están reemplazados por un aminoácido no natural (por ejemplo, un D-aminoácido) o por un compuesto orgánico.

La presente invención también se refiere a métodos para identificar péptidos o polipéptidos que activan linfocitos NKT y elimina tal activación alterando los epítomos de unión a CD1d por sustitución o delección de aminoácidos. Dichos métodos comprenden las etapas de incubar dicho péptido o polipéptido con células que portan CD1d, seguido de la adición de una población de linfocitos NKT policlonales y la determinación de la activación de dichos linfocitos NKT.

El método de la presente invención abarca además vectores víricos aislados caracterizados porque comprenden al menos un péptido o polipéptido de un alofactor modificado por sustitución o delección de al menos un aminoácido hidrófobo, o al menos un péptido o polipéptido de un alérgeno o de un agente infeccioso modificado por sustitución o delección de al menos un residuo de aminoácido hidrófobo. Debe entenderse que el propio vector vírico también se puede modificar por sustitución o delección de residuos de aminoácidos hidrófobos.

Definiciones

El término "péptido", cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectados por enlaces peptídicos, pero que en una realización particular puede comprender estructuras que no son aminoácidos (como por ejemplo un compuesto orgánico de enlace). Los péptidos según la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos no naturales incorporados por síntesis química de péptidos o por modificación química o enzimática. El término "polipéptido", cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a péptidos o proteínas generalmente más largos.

El término "epítomo", cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a una o varias porciones (que pueden

definir un epítipo conformacional) de una proteína que se reconocen específicamente y se unen a un anticuerpo o una porción del mismo (Fab', Fab2', etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito B o T, y que puede, mediante dicha unión, inducir una respuesta inmunitaria. El término "antígeno", cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más haptenos y/o que comprende uno o más epítopos de linfocitos T. Típicamente, dicha macromolécula es una proteína o péptido (con o sin polisacáridos) o está formada por una composición proteica y comprende uno o más epítopos; dicha macromolécula puede hacerse referencia alternativamente como "proteína antigénica" o "péptido antigénico".

El término "alérgeno" hace referencia a un subconjunto específico de antígenos caracterizado por su capacidad de provocar anticuerpos del isotipo IgE en individuos predispuestos.

El término "epítipo de linfocitos T" o "epítipo de linfocitos-T" en el contexto de la presente invención hace referencia a un epítipo de linfocitos T dominante, subdominante o minoritario, es decir, una parte de una proteína antigénica que se reconoce específicamente y se une a un receptor en la superficie celular de un linfocito T. Que un epítipo sea dominante, subdominante o minoritario depende de la reacción inmunitaria provocada contra el epítipo. La dominancia depende de la frecuencia a la que los linfocitos T reconocen tales epítopos y pueden activarlos, entre todos los posibles epítopos de linfocitos T de una proteína. En particular, un epítipo de linfocitos T es un epítipo unido por moléculas de MHC de clase I o de MHC de clase II.

El término "epítipo de linfocitos NKT" hace referencia a una parte de una proteína antigénica que se reconoce específicamente y se une a un receptor en la superficie celular de un linfocito T. En particular, un epítipo de linfocitos NKT es un epítipo unido por moléculas de CDId.

El término "células efectoras CD4+" hace referencia a células que pertenecen al subconjunto de linfocitos T positivos de CD4 cuya función es proporcionar ayuda a otras células, tales como, por ejemplo, linfocito B. Estas células efectoras se reseñan convencionalmente como linfocitos Th (por linfocitos T auxiliares), con diferentes subconjuntos tales como linfocitos Th0, Th1, Th2 y Th17.

El término "linfocitos NKT" hace referencia a células del sistema inmunitario innato caracterizadas por el hecho de que portan receptores tales como NK1.1 y NKG2D, y reconocen epítopos presentados por la molécula de CDId. En el contexto de la presente invención, los linfocitos NKT pueden pertenecer al subconjunto de tipo 1 (invariante) o de tipo 2.

La "molécula de CD1d" hace referencia a una molécula no derivada del MHC formada por 3 cadenas alfa y un conjunto antiparalelo de cadenas beta dispuestas en un surco hidrófobo profundo abierto en ambos lados y capaz de presentar lípidos, glicolípidos o péptidos hidrófobos a los linfocitos NKT.

El término "trastornos inmunitarios" o "enfermedades inmunitarias" hace referencia a enfermedades en las que una reacción del sistema inmunitario es responsable de o mantiene un mal funcionamiento o una situación no fisiológica en un organismo. Los trastornos inmunitarios en el contexto de la presente invención hacen referencia a patología inducida por agentes infecciosos y vigilancia tumoral.

El término "alofactor" hace referencia a una proteína, péptido o factor (es decir, cualquier molécula) que exhiba polimorfismo cuando se compara entre dos individuos de la misma especie y, más en general, cualquier proteína, péptido o factor que induce una respuesta inmunitaria (alorreactiva) en el sujeto que recibe el alofactor. Por extensión, los alofactores también incluyen proteínas genéticamente modificadas usadas para la alimentación.

El término "aloantígeno" o "antígeno de aloinjerto", cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a un antígeno derivado de (desprendido de y/o presente en) una célula o tejido que, cuando se transfiere de un donante a un receptor, puede reconocerse y unirse a un anticuerpo de receptor de linfocitos B o T del receptor. Los aloantígenos son típicamente productos de genes polimórficos. Un aloantígeno es una proteína o péptido que, cuando se compara entre donante y receptor (que pertenecen a la misma especie), exhibe ligeras diferencias estructurales. La presencia de tal antígeno donante en el cuerpo de un receptor puede provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. Tal respuesta inmunitaria alorreactiva es específica del aloantígeno.

Descripción detallada de la invención

Se describen en este documento formas de prevenir, en un sujeto, una respuesta inmunitaria frente a alofactores, frente a vectores víricos usados para terapia génica o vacunación génica, frente a proteínas usadas como alimento o pienso, frente a proteínas a las que dicho sujeto está expuesto por inhalación o picaduras o para prevenir, en un sujeto, una activación indeseable de la inmunidad innata en el uso de vacunas frente a alérgenos o agentes infecciosos.

En particular, se describen las formas de prevenir la expansión y la actividad funcional de linfocitos NKT CD4+. Tales células se clasifican habitualmente en dos subconjuntos distintos, a saber, el tipo 1 para linfocitos NKT que portan una cadena alfa de TCR invariante (Valpha14 en el ratón, Valpha24 en seres humanos) o linfocitos NKT de tipo 2

que presentan un repertorio de cadena alfa diverso. Sin embargo, la evidencia reciente ha sugerido que subconjuntos alternativos de linfocitos NKT no encajan en la categoría de tipo 1 o tipo 2. Es el objetivo de la presente divulgación incluir estos linfocitos NKT no convencionales, siempre que porten el correceptor CD4. Tras la presentación de un antígeno unido a CD1d, los linfocitos NKT se activan rápidamente y secretan una serie de citocinas que se cree que son determinantes para influir en otras células tanto del sistema inmunitario innato como adaptativo. En algunas circunstancias, dichos linfocitos NKT activados adquieren o aumentan las propiedades citotóxicas. En otras circunstancias adicionales, dichos linfocitos NKT activados suprimen o reducen la provocación de una respuesta inmunitaria adaptativa por interacción con linfocitos T CD4 + restringidos a la clase II.

En el contexto de la presente invención, se realizó la observación inesperada de que los péptidos pueden presentarse por la molécula de CD1d. Una característica de la molécula de CD1d es que está formada por dos cadenas alfa antiparalelas que forman una hendidura sobre una plataforma compuesta por dos cadenas beta antiparalelas. La hendidura es estrecha y profunda y solo acepta residuos hidrófobos, que clásicamente se han considerado solo lípidos. La hendidura puede acomodar una secuencia de 7 aminoácidos caracterizada como un residuo hidrófobo en la posición (P)1 y 7 y un residuo alifático en P4. P1 es un residuo hidrófobo obligado, tal como F, W, H o Y. Sin embargo, P7 es permisivo y puede contener residuos alternativos siempre que no sean polares. Los residuos en P4 son preferiblemente alifáticos pero son opcionales. La secuencia para un motivo de unión a CD1d es por lo tanto [FWTHY]-X₂X₃-[ILMV]-X₅X₆-[FWTHY]. Sin embargo, debe quedar claro para los expertos en la materia que el motivo es simétrico y que P7 se puede considerar como P1, y P1 se puede considerar como P7. Los péptidos y polipéptidos considerados para la aplicación de la presente invención se definen según su capacidad para activar linfocitos NKT por presentación en una molécula de CD1d. Los péptidos o polipéptidos hidrófobos capaces de activar linfocitos NKT y, por consiguiente, portar un motivo de unión a CD1d, se encuentran en alofactores, vectores víricos, proteínas usadas para alimentos o piensos, proteínas a las que dicho sujeto está expuesto por inhalación o picaduras, proteínas genéticamente modificadas y alérgenos, dotando así a dicho alofactor, vector vírico, proteína genéticamente modificada o alérgeno con la capacidad de activar linfocitos NKT CD4+.

La presente invención se refiere a la producción de péptidos o polipéptidos que contienen un motivo o motivos de unión a CD1d, que les confiere la capacidad de activar linfocitos NKT y que se modifican por sustitución de residuos hidrófobos en P1 y/o P7, opcionalmente, con sustitución o delección de residuos alifáticos en P4, o cualquier combinación de estos, que da como resultado una pérdida o reducción significativa de la capacidad de péptidos o polipéptidos de unirse a CD1d y así da como resultado una pérdida o reducción significativa de la activación por dichos péptidos o polipéptidos de linfocitos NKT.

En una realización más particular, F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y/o P7 se reemplazan por un residuo de aminoácido no hidrófobo, u opcionalmente, I, L, M o V en la posición P4 se reemplaza por un residuo no alifático, o cualquier combinación de estos.

En aún otra realización particular, los residuos hidrófobos localizados en la posición P1 y/o P7, u opcionalmente, los residuos alifáticos localizados en P4, o cualquier combinación de estos, se reemplazan por al menos un aminoácido no natural diferente de F, W, T, H o Y no naturales, o por un compuesto orgánico no aromático.

En aún otra realización particular, se añade al menos un aminoácido dentro del motivo de unión a CD1d, en cualquier localización dentro de la secuencia P1 a P7, que desestabiliza el motivo y le priva de su capacidad para unirse a CD1d y así de su capacidad para activar linfocitos NKT.

En una realización preferida, los aminoácidos no naturales son D-aminoácidos.

La presente invención también se refiere a la producción de péptidos o polipéptidos que contienen un motivo o motivos de unión a CD1d, que les confieren la capacidad de activar linfocitos NKT, y que están modificados por delección de residuos hidrófobos en P1 y/o P7, u opcionalmente, por delección de residuos alifáticos en P4, o cualquier combinación de estos, que da como resultado una pérdida o reducción significativa de la capacidad de péptidos o polipéptidos para unirse a CD1d y así da como resultado una pérdida o reducción significativa de la activación por dichos péptidos o polipéptidos de linfocitos NKT.

Tras la administración a un sujeto, dichos péptidos o polipéptidos no se cargan en CD1d y así se previene que activen linfocitos NKT.

En un aspecto adicional, se divulga el uso de al menos un péptido o polipéptido aislado que comprende al menos una sustitución o delección de F, W, T, H o Y en las posiciones P1 o P7 para prevenir en un sujeto una respuesta inmunitaria frente a la administración de alofactor, la administración de vectores víricos, proteínas a las que dicho sujeto se expone por alimento, pienso, vía sistémica o por inhalación, o alérgenos o agentes infecciosos usados con fines de vacunación. Se divulga en la presente memoria el uso de al menos un péptido o polipéptido aislado que comprende al menos una sustitución o delección de F, W, T o H en las posiciones P1 o P7 para prevenir en un sujeto la activación de linfocitos NKT frente a la administración de alofactor, la administración de vector vírico, proteínas a las que dicho sujeto se expone por alimento, pienso, vía sistémica o por inhalación, o algunos alérgenos o agentes infecciosos usados con fines de vacunación. Se divulga en la presente memoria el uso de al menos un péptido o

polipéptido aislado que comprende al menos una sustitución o delección de F, W, T, H o Y en las posiciones P1 o P7 como medicamento para prevenir en un sujeto una respuesta inmunitaria frente a la administración alofactor, la administración de vectores víricos, proteínas a las que dicho sujeto se expone por alimento, pienso, vía sistémica o por inhalación, péptidos o polipéptidos genéticamente modificados o algunos alérgenos o agentes infecciosos usados con fines de vacunación.

El número de motivos de unión a CD1d cuando están presentes en un péptido o polipéptido es muy limitado. Se proporcionan a continuación ejemplos de tales péptidos o polipéptido. Típicamente, un polipéptido presenta uno a cinco de estos motivos.

Una ventaja adicional de la presente invención es que la molécula de CD1d presenta un grado muy limitado de polimorfismo. Por lo tanto, es obvio para el experto en la técnica que las mismas sustituciones o delecciones de aminoácidos según la presente invención proporcionan péptidos o polipéptidos útiles para todos o para la gran mayoría de los sujetos. Esto está en marcado contraste con los motivos peptídicos o polipeptídicos que se unen a las moléculas del MHC de clase II, en los que se puede delimitar un gran número de péptidos que contienen la secuencia apropiada. Esto se debe a las restricciones mínimas impuestas a los péptidos de unión a MHC de clase II y al gran polimorfismo de las moléculas de clase II.

Los péptidos y polipéptidos que son el objeto de la presente invención se identifican como sigue:

(1) Se evalúa en una secuencia aminoacídica de péptido o polipéptido la presencia de al menos un motivo CD1d que contiene un residuo hidrófobo en P1 y P7, y un residuo alifático en P4. Se usa la secuencia [FWTHY]-X₂X₃-[ILMV]-X₅X₆-[FWTHY] para usar algoritmos bien conocidos en la materia, tales como Scanprosite en el sitio web Expasy.

Esta secuencia general debe considerarse como una herramienta para ayudar a identificar qué secuencia o secuencias en dicho péptido o polipéptido contienen un motivo que podría posibilitar que dicho péptido o polipéptido active linfocitos NKT.

(2) Se prueba la capacidad del péptido o polipéptido para unirse a CD1d y para activar linfocitos NKT in vitro usando una línea celular que expresa la molécula de CD1d. Se conocen ejemplos de tales líneas celulares en la materia (por ejemplo, células JAWS2). En una realización preferida, la línea celular no presenta moléculas de MHC de clase II y se transduce por hiperexpresión de CD1d usando un vector vírico que contiene la secuencia de ADN de CD1d o cualquier otro medio conocido en la materia para introducir un gen en una célula. Los métodos para transducción celular son conocidos en la materia. La línea celular se carga en cultivo con el péptido o polipéptido, o con un péptido sintético que abarca la secuencia correspondiente. Tales péptidos sintéticos se producen fácilmente por síntesis, usando, por ejemplo, la síntesis en fase sólida con Fmoc bien conocida en la materia. Se evalúa entonces la presentación eficiente del péptido, polipéptido o péptido sintético correspondiente por la molécula de CD1d midiendo la activación de linfocitos NKT. Tales células se pueden obtener a partir de sangre periférica mediante, por ejemplo, clasificación magnética y se mantienen en cultivo con estimulantes tales como alfa-gal-ceramida, en presencia de citocinas tales como IL-2, IL-15 o IL-7. Estos métodos se describen en la técnica (véase, por ejemplo, Godfrey *et al.*, Nature Reviews. Immunology 2010, 11: 197-206). Se valora la activación de linfocitos NKT usando métodos tales como la evaluación de la producción de citocinas.

Como alternativa, los péptidos presentados realmente por APC en moléculas de CD1d pueden eluirse y separarse mediante diversos métodos de cromatografía. La descripción completa de tal metodología se encontrará en Scott *et al.*, Immunity, 12: 711-720, 2000. Dichos péptidos se secuencian entonces para identificar qué residuos de aminoácidos se encuentran en P1 y P7.

Como alternativa, dichos péptidos sintéticos pueden cargarse en tetrámeros de la molécula de CD1d para detectar linfocitos NKT específicos de dicho péptido. Una posibilidad es usar tetrámeros marcados con fluorescencia y detección usando un sistema de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS).

(3) Las secuencias de aminoácidos identificadas como capaces de activar linfocitos NKT y, opcionalmente identificadas por algoritmos, se modifican entonces por sustitución o delección. En una realización preferida, F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y/o P7 se reemplazan por al menos un aminoácido diferente de F, W, T, H, Y. Los aminoácidos naturales se pueden modificar mediante modificaciones postranscripcionales o sustituirse con grupos químicos tales como grupos metilo. En otra realización preferida, F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y/o P7 se reemplazan por cualquier aminoácido no natural alternativo adecuado. Son ejemplos de residuos de aminoácidos no naturales los D-aminoácidos. En otra realización más, F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y/o P7 se reemplazan por al menos un aminoácido diferente de F, W, T, H, Y. En otra realización preferida, F, W, T, H o Y en la posición P1 se reemplaza por al menos un aminoácido diferente de F, W, T, H, Y, por cualquier aminoácido alternativo no natural adecuado o por un compuesto orgánico no aromático. Tal sustitución de aminoácidos se obtiene usando métodos bien conocidos en la materia. En aún otra realización preferida, se elimina F, W, T, H o Y en la posición P1. En aún otra realización, se eliminan F,

W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7. Los métodos para llevar a cabo dichas delecciones son bien conocidos en la materia. En aún otra realización particular, se añade al menos un aminoácido dentro del motivo de unión a CDId, en cualquier localización dentro de la secuencia de P1 a P7.

5 Según la presente divulgación, se prevén medicamentos para el tratamiento de enfermedades en las que se requiere la administración de alofactores, tales como en:

10 (1) deficiencia congénita o adquirida de factores asociados con la coagulación (tales como factor VIII, factor IX o factor X) o fibrinólisis, con defecto en enzimas asociadas con el metabolismo de polisacáridos o glucógeno (tales como en la enfermedad de Pompe), o con defecto en la producción de hormonas (tales como la insulina en la diabetes o la hormona del crecimiento en el enanismo),

15 (2) situaciones agudas o crónicas en las que es ventajoso administrar un agente curativo, tal como agentes trombolíticos que incluyen estafilocinasa y microplasma,

(3) trastornos del sistema inmunitario en los que se requiere administrar citocinas (o su receptor) o factores de crecimiento (tales como interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, G-CSF, GM-CSF, KGF o eritropoyetina),

20 (4) enfermedades caracterizadas por inflamación crónica o respuestas inmunitarias inapropiadas, en las que se deben administrar anticuerpos terapéuticos, incluyendo anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral, anti-CD3 o anti-CD4 en enfermedades autoinmunitarias y rechazo de injertos, anticuerpos contra marcadores de superficie de linfocitos (tales como anticuerpos anti-CD20 en linfomas no de Hodgkin) o anticuerpos contra el factor VIII en la prevención de la trombosis. La lista de anticuerpos terapéuticos está creciendo rápidamente y la presente invención pretende cubrir el uso de cualquier anticuerpo usado para fines terapéuticos en general.

25 Según la presente divulgación, también se prevén medicamentos para uso en terapia génica y vacunación génica, en los que se utilizan vectores víricos y en los que la respuesta inmunitaria contra dichos vectores impide la expresión transgénica.

30 Según la presente divulgación, también se prevén medicamentos para enfermedades provocadas por la exposición a proteínas ambientales, tales como:

35 (1) Proteínas a las que dicho sujeto está expuesto por comida o pienso. Son ejemplos de estos cereales tales como el trigo, el maíz, el arroz, la soja y la colza, verduras tales como la patata y la remolacha, frutas tales como rosáceas, nueces y aguacate, enzimas, medicamentos antivíricos o antibacterianos.

40 (2) Proteínas a las que el sujeto está expuesto por inhalación, vía sistémica o por picadura. Son ejemplos de estas reacciones alérgicas al polen, reacción de contacto al látex o picaduras de himenópteros.

Según la presente divulgación, también se prevén medicamentos para la inmunización (vacunación) tales como:

45 (1) vacunación contra alérgenos,

(2) vacunación contra agentes infecciosos, incluyendo virus, bacterias y parásitos.

50 En ambas circunstancias, puede ser ventajoso prevenir una activación del sistema inmunitario innato para prevenir el exceso de inflamación y sus consecuencias perjudiciales sobre el resultado de dicha vacunación. Otra ventaja en el entorno de la vacunación frente a alérgenos o agentes infecciosos es que la eliminación de la activación de linfocitos NKT previene el efecto supresor de los linfocitos NKT activados sobre el desarrollo de una respuesta adaptativa contra dichos alérgenos o dichos agentes infecciosos.

55 Debe reconocerse que la lista anterior no es exhaustiva y que la invención pretende cubrir productos recientemente introducidos tales como anticuerpos, citocinas, factores de crecimiento o péptidos y polipéptidos usados como reemplazo en deficiencias congénitas o adquiridas, y proteínas genéticamente modificadas.

60 Debe entenderse que cualquiera de los péptidos o polipéptidos enumerados anteriormente se puede administrar en forma de gen para transgénesis, que se puede llevar a cabo usando vectores víricos u otros medios conocidos por los expertos en la técnica. En tal caso, el propio vector vírico puede modificarse según la presente invención eliminando los motivos de unión a CDId.

65 El medicamento es habitualmente, aunque no necesariamente, una formulación (farmacéutica) que comprende como ingrediente activo al menos uno de los péptidos o polipéptidos de la invención o un vector terapéutico génico

capaz de expresar dichos péptidos o polipéptidos. Además del ingrediente o ingredientes activos, tal formulación comprenderá al menos uno de un diluyente (farmacéuticamente aceptable).

Una excepción notable a esta regla es el uso de proteínas de organismos genéticamente modificados para alimentos o piensos, exposición por inhalación o por vía sistémica.

En general, la administración de péptidos o polipéptidos de la invención previene la activación del sistema inmunitario innato, más particularmente la activación de linfocitos NKT, más particularmente la producción de citocinas asociadas con la activación de linfocitos NKT.

La vía de administración para péptidos o polipéptidos de la presente invención puede variar según la indicación y/o la naturaleza de los péptidos o polipéptidos. Son ejemplos la inyección intravenosa de factores de coagulación, la inyección subcutánea de insulina y la administración oral de proteínas genéticamente modificadas. La presente invención pretende cubrir todas las otras posibles vías de administración tales como intranasal, sublingual, percutánea, intramuscular, intrarrectal o intravaginal.

Como se explica en detalle más adelante, los péptidos o polipéptidos de la presente invención se pueden preparar mediante síntesis química, que además permite la incorporación de aminoácidos no naturales. Los péptidos o polipéptidos de la presente invención también se pueden producir usando métodos conocidos en la técnica para la producción de proteínas recombinantes usando sistemas de expresión tales como células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células vegetales o células de mamífero.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para generar péptidos y polipéptidos de la presente invención descritos en la presente memoria. Tales métodos incluyen la identificación de epítopos de linfocitos NKT de alofactores, vectores víricos, proteínas a las que dicho sujeto está expuesto por alimento, pienso, vía sistémica o por inhalación, alérgenos o agentes infecciosos específicos. Las formas para la identificación *in vitro* e *in silico* de los epítopos de linfocitos NKT son ampliamente conocidas en la materia y algunos aspectos se desarrollan de aquí en adelante.

La identificación de un epítipo de linfocitos NKT en el contexto de la presente invención es conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias peptídicas aisladas de alofactores, vectores víricos, proteínas a las que dicho sujeto se expone por alimento, pienso, vía sistémica o por inhalación, proteínas genéticamente modificadas, alérgenos o agentes infecciosos específicos se prueban mediante, por ejemplo, técnicas de biología de linfocitos NKT, para determinar si las secuencias peptídicas provocan una respuesta de linfocitos NKT. Aquellas secuencias peptídicas que se encuentra que provocan una respuesta de linfocitos NKT se definen como que tienen actividad estimulante de linfocitos NKT. La actividad estimulante de linfocitos NKT de mamífero puede probarse adicionalmente cultivando linfocitos NKT obtenidos de un individuo sensibilizado frente a un alofactor, vector vírico, proteínas a las que dicho sujeto se expone por alimento, pienso, vía sistémica o por inhalación, proteína modificada genéticamente, alérgeno o agente infeccioso específico, y determinando si aparece proliferación de linfocitos NKT en respuesta al péptido/epítipo medida, por ejemplo, mediante la captación celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación para respuestas de linfocitos NKT frente a péptidos/epítopos se pueden calcular como las CPM máximas en respuesta a un péptido/epítipo dividido entre las CPM de control. Un índice de estimulación de linfocitos NKT (IE) igual o mayor a dos veces el nivel de fondo se considera "positivo". Los resultados positivos se usan para calcular el índice de estimulación medio para cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítopos ensayados. En los epítopos de linfocitos NKT no naturales puede probarse adicionalmente su afinidad de unión a las moléculas de CDId. La unión de epítopos de linfocitos NKT no naturales a moléculas de CDId puede practicarse de diferentes formas. Por ejemplo, se obtienen moléculas de CDId soluble y se vuelven tetraméricas por síntesis y/o acoplamiento químico. La molécula de CDId se purifica por cromatografía de afinidad. Las moléculas de CDId soluble se incuban con un péptido de referencia marcado con biotina producido según su fuerte afinidad de unión por dicha molécula de CDId. Los péptidos para valorar la unión a CDId se incuban entonces a diferentes concentraciones y se calcula su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su sitio de unión a CDId mediante la adición de neutravidina. Pueden encontrarse métodos, por ejemplo, en Texier *et al.*, (2000) J. Immunology 164, 3177-3184) para péptidos presentados por los determinantes del MHC de clase II, pero el método puede aplicarse fácilmente a epítopos de linfocitos NKT restringidos a CD1d. Los péptidos o polipéptidos inmunogénicos de la invención tienen un índice medio de estimulación de linfocitos NKT mayor o igual a 2. Un péptido inmunogénico que tiene un índice de estimulación de linfocitos NKT mayor o igual a 2 se considera útil como candidato para llevar a cabo la sustitución o delección de residuos de aminoácidos hidrófobos, o la adición de aminoácidos, dentro de la secuencia del motivo de unión a CDId, como se describe en la presente invención.

Si se encuentra que dos o más secuencias de aminoácidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia peptídica o polipeptídica nativa tienen actividad estimulante de linfocitos NKT humanos, según se determina mediante técnicas de biología de linfocitos T, puede llevarse a cabo la mutación o delección de residuos de aminoácidos hidrófobos para residuos pertenecientes a una o a ambas secuencias.

Los péptidos o polipéptidos de la invención se pueden producir por expresión recombinante en, por ejemplo, células bacterianas (p.ej. *Escherichia coli*), células de levadura (p.ej., especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies

de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*), células de insectos (p.ej., *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), células vegetales o células de mamíferos (p.ej., células CHO, COS). La construcción de los vectores de expresión adecuados requeridos, por lo tanto (que incluyen información adicional tal como secuencias promotoras y de terminación) implica paralelamente técnicas de ADN recombinante estándares. Los péptidos o polipéptidos producidos recombinantemente de la invención se pueden derivar de una proteína precursora más grande, p.ej., mediante escisión enzimática de sitios de escisión enzimática insertados adyacentes al extremo N y/o C del péptido o polipéptido, seguido de una purificación adecuada.

En vista de la longitud limitada de algunos de los péptidos de la invención, se pueden preparar mediante síntesis química de péptidos, en la que los péptidos se preparan acoplando los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión de, p.ej., D-aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales no naturales o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tales como cisteína metilada. Los métodos de síntesis de péptidos químicos están bien descritos y los péptidos se pueden encargar a compañías tales como Applied Biosystems y otras compañías. La síntesis de péptidos puede practicarse como síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) o por el contrario síntesis de péptidos en fase de solución. Los métodos mejor conocidos de SPPS son la química en fase sólida de t-Boc y Fmoc, que es ampliamente conocida por el experto. Además, los péptidos se pueden ligar entre sí para formar péptidos más largos usando una estrategia de ligación (acoplamiento quimioselectivo de dos fragmentos peptídicos no protegidos) como se describe originalmente por Kent (Schmolzer y Kent (1992) Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193) y revisado por ejemplo en Tam *et al.* (2001) Biopolymers 60, 194-205. Esto proporciona el potencial para conseguir la síntesis de proteínas que están más allá del alcance de la SPPS. Muchas proteínas con un tamaño de 100-300 residuos se han sintetizado con éxito mediante este método.

Se examinan las propiedades físicas y químicas de un péptido o polipéptido de la invención (p.ej., solubilidad, estabilidad) para determinar si el péptido es/sería adecuado para uso en composiciones terapéuticas. Típicamente, esto se optimiza ajustando la secuencia del péptido. Opcionalmente, el péptido puede modificarse después de la síntesis (modificaciones químicas, p.ej., agregando/eliminando grupos funcionales) usando técnicas conocidas en la materia.

La producción de organismos genéticamente modificados se basa en métodos bien conocidos por los expertos en la materia, incluyendo clonación, mutagénesis dirigida a sitio y crecimiento. Se divulgan en la presente memoria secuencias de ácidos nucleicos que codifican los péptidos o polipéptidos de la presente invención y métodos para su uso, p.ej., para expresión recombinante o en terapia génica. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico son capaces de expresar péptidos de la invención.

En terapia génica, las moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican los péptidos o polipéptidos de la presente invención se pueden usar como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para el suministro a células diana. Son bien conocido por los expertos en la materia otros métodos para la transferencia directa de ADN plasmídico a células para su uso en terapia génica humana, e implican orientar el ADN a receptores en células complejando el ADN plasmídico con proteínas. En su forma más simple, la transferencia de genes se puede practicar simplemente inyectando cantidades diminutas de ADN en el núcleo de una célula, a través de un proceso de microinyección. Una vez que los genes recombinantes se introducen en una célula, pueden reconocerse por los mecanismos normales de la célula para transcripción y traducción, y se expresará un producto génico. También se han intentado otros métodos para introducir ADN en un mayor número de células. Estos métodos incluyen: transfección, en la que el ADN se precipita con fosfato de calcio y se lleva a las células mediante pinocitosis; electroporación, en la que las células se exponen a grandes pulsos de voltaje para introducir orificios en la membrana; lipofección/fusión de liposomas, en la que el ADN se empaqueta en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo de partículas usando ADN unido a proyectiles pequeños. Otro método para introducir ADN en las células es acoplar el ADN con proteínas químicamente modificadas. Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar endosomas y potenciar la captación de ADN en las células. La mezcla de adenovirus con soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN a polilisina enlazada covalentemente con adenovirus usando agentes reticulantes de proteínas mejora sustancialmente la captación y la expresión del gen recombinante. Los vectores de virus adenoasociados también pueden usarse para el suministro de genes a las células vasculares. Como se usa en la presente memoria, "transferencia génica" significa el proceso de introducir una molécula de ácido nucleico extraña en una célula, que se practica comúnmente para posibilitar la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, polipéptido, ADN o ARN antisentido, o ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica puede practicarse en células cultivadas o mediante administración directa a mamíferos. En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de molécula de ácido nucleico que codifica un péptido según la invención. En realizaciones particulares, el vector se genera de tal modo que la secuencia de la molécula de ácido nucleico se exprese solo en un tejido específico. Los métodos para conseguir la expresión génica específica de tejido son bien conocidos en la materia, p.ej., disponiendo la secuencia que codifica un péptido inmunogénico de la invención bajo el control de un promotor, que dirige la expresión del péptido específicamente a uno o más tejidos u órganos. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, virus de ARN o papilomavirus bovino se pueden usar para el suministro de secuencias de nucleótidos (p. ej., ADNc) que codifican péptidos, homólogos o derivados de los mismos según la invención a los tejidos o población celular diana. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para

construir vectores víricos recombinantes que contienen tales secuencias codificantes. Como alternativa, las células genomanipuladas que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido según la invención se pueden usar en terapia génica.

5 El medicamento es habitualmente, pero no necesariamente (por ejemplo, proteínas producidas por organismos genéticamente modificados que se usan para alimentos, piensos, o a las que dicho sujeto se expone por vía sistémica o por inhalación), una formulación (farmacéutica) que comprende como ingrediente activo al menos uno de los péptidos o polipéptidos de la invención o un vector génico terapéutico capaz de expresar dicho péptido o polipéptido. Además del ingrediente o ingredientes activos, tal formulación comprenderá al menos uno de un diluyente (farmacéuticamente aceptable). Típicamente, se pueden encontrar compuestos farmacéuticamente aceptables en, por ejemplo, un manual de farmacopea (por ejemplo, farmacopea estadounidense, europea o internacional). El medicamento o composición farmacéutica de la invención normalmente comprende una cantidad (profiláctica o terapéuticamente) eficaz del ingrediente o ingredientes activos, el que la eficacia es relativa a la afección o trastorno que para prevenir o tratar.

15 El medicamento o la composición farmacéutica puede necesitar administrarse a un sujeto que lo necesita como parte de un régimen profiláctico o terapéutico que comprende múltiples administraciones de dicho medicamento o composición. Dichas administraciones múltiples usuales ocurren secuencialmente y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede variar y se ajustará a la naturaleza del ingrediente activo y a la naturaleza de la afección para prevenir o tratar. La cantidad de ingrediente activo administrada a un sujeto que necesita una administración única también puede variar y dependerá de factores tales como el estado físico del sujeto (como por ejemplo, peso y edad), el estado de la afección para prevenir o tratar y la experiencia del doctor, médico o enfermera tratante.

25 El término "diluyentes" hace referencia, por ejemplo, a soluciones salinas fisiológicas. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquier material o sustancia con la que se formula el ingrediente activo para facilitar su aplicación o diseminación al lugar para tratar, por ejemplo disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y/o facilitar su almacenamiento, transporte o manejo sin perjudicar su efectividad. Incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Se pueden incluir ingredientes adicionales para controlar la duración de la acción del ingrediente activo en la composición. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones de esta invención se pueden usar adecuadamente como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos finos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, gránulos o polvos. Los vehículos farmacéuticos adecuados para uso en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación son bien conocidos por los expertos en la materia. También pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, adherentes, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (como azúcares o cloruro de sodio) y similares, siempre que los mismos sean consistentes con la práctica farmacéutica, es decir, vehículos y aditivos que no crean daño permanente a los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar de cualquier manera conocida, por ejemplo mezclando homogéneamente, revistiendo y/o triturando los ingredientes activos, en un método de una o múltiples etapas, con el material de vehículo seleccionado y, cuando sea apropiado, los demás aditivos. tales como agentes tensioactivos. También se pueden preparar por micronización, por ejemplo a fin de obtenerlos en forma de microesferas que habitualmente tienen un diámetro de aproximadamente 1 a 10 µm, a saber, para la fabricación de microcápsulas para la liberación controlada o mantenida de los ingredientes activos.

50 Los péptidos o polipéptidos, homólogos o derivados de los mismos (y sus sales fisiológicamente aceptables o composiciones farmacéuticas incluidas todas en el término "ingredientes activos") pueden administrarse por cualquier vía apropiada para la afección para prevenir o tratar y apropiada para los compuestos, aquí el péptido o polipéptido para administrar. Las posibles vías incluyen regional, sistémica, oral (forma sólida o inhalada), rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar, por ejemplo, con la afección del receptor o con la afección para prevenir o tratar.

55 Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la materia de la farmacia. Las formulaciones adecuadas para la administración oral se pueden presentar en unidades discretas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvo o gránulos; como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. El ingrediente activo también se puede presentar como una inyección intravenosa rápida, un electuario o una pasta. Un comprimido se puede elaborar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes secundarios. Se pueden preparar comprimidos prensados comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma fluida tal como polvo o gránulos, mezclada opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o agente dispersante. Se pueden elaborar comprimidos moldeados moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto pulverizado humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden recubrir o marcar opcionalmente y se pueden formular tal como

para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en ellos.

Los vectores víricos con el fin de terapia génica o vacunación génica son altamente susceptibles de modificaciones por medio de la tecnología de ácido nucleico recombinante. A la vista de lo anterior, una persona experta preverá además fácilmente que la eliminación del epítipo de linfocitos NKT del vector vírico, tal como se aplica en los péptidos o polipéptidos y sus usos, puede introducirse inmediatamente en el propio vector vírico. Por ello, la divulgación abarca además vectores víricos modificados definidos como vectores víricos aislados caracterizados porque los motivos de unión a CDId se han eliminado por sustitución o delección de aminoácidos.

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos, que se proporcionan sin ninguna intención limitante. Además, todas las referencias descritas en la presente memoria se incluyen explícitamente en la presente memoria como referencia.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Factor de coagulación VIII

Los pacientes que padecen hemofilia A carecen de cantidades suficientes de factor VIII (FVIII), que es la razón de la tendencia a hemorragias no controladas. Tales pacientes se tratan mediante infusiones de FVIII purificado de una fuente de plasma o producido mediante tecnología recombinante. La administración de FVIII da como resultado la formación de anticuerpos específicos, que en más o menos el 30% de los casos inhiben la función del FVIII como cofactor de la coagulación.

Usando un algoritmo, se identificaron dentro de la secuencia de la molécula de FVIII 3 secuencias portadoras de una secuencia de unión de CDId, que coincidía con el motivo de secuencia [FWTHY]-X₂X₃-[ELMV]-X₅X₆-[FWTHY]. Estos motivos se localizan en los dominios A1 y A3, respectivamente:

FCHISSH en el dominio A1 (aminoácidos 309-315, SEC ID1)

FWKVQHH en el dominio A3 (aminoácidos 1816-1822, SEQ ID2)

FHAINGY en el dominio A3 (aminoácidos 1918-1924, SEQ ID3)

Estas secuencias tienen en común (subrayado) un residuo aromático (fenilalanina, F) en la posición 1, un residuo alifático (isoleucina, I o valina, V) en la posición 4 y un residuo aromático (histidina, H o tirosina, Y) en la posición 7.

Para determinar si estas secuencias podrían activar linfocitos NKT in vivo, se inyectó FVIII (2 UI) por vía intravenosa a ratones con hemofilia A en 4 ocasiones separadas por un intervalo de 1 semana. Los ratones con hemofilia A no producen FVIII debido a un codón de terminación introducido en el gen de FVIII en el exón 16.

Los ratones se sacrificaron 10 días después de la última inyección, se extirpó el bazo y se prepararon linfocitos T CD4+ mediante clasificación por perlas magnéticas. Los linfocitos NKT se caracterizan por la expresión de CD4 y el reconocimiento del antígeno presentado por la molécula de CDId. Se obtuvo un tetrámero de CDId a partir de un proveedor comercial y se cargó con péptidos de FVIII de 15 aminoácidos de longitud, que incluían péptidos que contenían las SEQ ID1, SEQ ID2 y SEQ ID3. Se observó una unión significativa de los tetrámeros de CDId cargados con estos péptidos, lo que indica que estos 3 péptidos fueron capaces de unirse a CDId y que la inyección de FVIII provocó la activación de linfocitos NKT. Se dan resultados representativos en la Figura 1.

Además, la inmunización directa con péptidos que contienen un motivo de CDId (péptidos de SEQ ID1, SEQ ID2 o SEQ ID3) era suficiente para provocar la activación de linfocitos NKT y la producción de anticuerpos contra FVIII. Se observó una activación destacada con el péptido de SEQ ID1. Se dan resultados representativos en la Figura 2.

Se construyeron quimeras de médula ósea en las que ratones con hemofilia A se irradiaron primero y se reconstituyeron con la médula ósea de ratones que carecían de linfocitos NKT, a saber ratones con desactivación génica de CDId. En ausencia de linfocitos NKT, los ratones no pudieron producir cantidades significativas de anticuerpos contra FVIII, y prácticamente ningún anticuerpo que inhibiera la función de FVIII (Figura 3).

El dominio A1 de FVIII se produjo mediante tecnología recombinante en su secuencia natural o con una sustitución de F309 y H315 por serina (polipéptido de SEQ ID4). Se usaron los dominios A1 de FVIII en secuencia natural o la SEQ ID4 para inmunizar grupos separados de ratones. Los resultados mostraron que la sustitución de F309 y H315 por S (SEC ID4) era suficiente para prevenir la activación de linfocitos NKT según se valoró a partir de linfocitos T CD4+ de bazo como se describe anteriormente.

El dominio A3 de FVIII se produjo por tecnología recombinante en su secuencia natural o con una sustitución de F1816 y H1822 por serina (polipéptido de SEC ID 5). Se usaron los dominios A3 de FVIII en secuencia natural o la SEQ ID5 para inmunizar grupos separados de ratones. Los resultados mostraron que la sustitución de F1816 y

H1822 por S (SEC ID5) era suficiente para prevenir la activación de linfocitos NKT según se valoró a partir de linfocitos T CD4+ de bazo como se describe anteriormente.

Una molécula de FVIII con delección del dominio B en su secuencia natural provocó la activación de linfocitos NKT (véase anteriormente). Se preparó una molécula de FVIII con 4 sustituciones de aminoácidos que contenía F309S, H315S, F1816S y F1918S (SEC ID6). Las inyecciones intravenosas de tal FVIII mutado en ratones con hemofilia A no dieron como resultado la formación de anticuerpos contra FVIII y, en consecuencia, ningún anticuerpo que inhibiera la función de FVIII.

Por lo tanto, se concluyó que:

(1) el FVIII contiene naturalmente varios motivos de unión a CDId;

(2) estos motivos de CDId son funcionales y provocan la activación de linfocitos NKT;

(3) la activación de linfocitos NKT es un requisito para la producción de anticuerpos contra FVIII;

(4) la eliminación de los motivos de CDId por sustitución de aminoácidos es suficiente para eliminar la producción de anticuerpos anti-FVIII.

Debe quedar claro para los expertos en la materia que la invención también se aplica a animales transgénicos para la producción de factores de coagulación tales como el factor IX.

Descripción detallada de los dibujos

Figura 1

Los linfocitos NKT reconocen epítopos de factor VIII presentados por CDId

Se inmunizaron ratones con hemofilia A con 2 UI de factor VIII en 4 ocasiones separadas por una semana. Se retiró entonces el bazo y se prepararon linfocitos T CD4+ por clasificación de perlas magnéticas. Se obtuvo un tetrámero de CDId marcado con fluorocromo de un proveedor comercial y se cargó con péptidos de FVIII de 15 aminoácidos de longitud, que incluían péptidos que contenían las SEQ ID1, ID2 e ID3. La carga se llevó a cabo a temperatura ambiente durante la noche en la oscuridad. Los tetrámeros se incubaron entonces durante 30 minutos a 4 °C con la población de linfocitos T CD4+ y se analizó la suspensión celular mediante Facs.

La figura muestra que los tetrámeros de CDId cargados con el péptido de SEQ ID1 (44pept en la figura) son reconocidos por los linfocitos NKT. El ctl(-) de CDId muestra el % de linfocitos NKT que reconocen tetrámeros descargados. El ctl (+) de CDId muestra el % de linfocitos NKT que reconocen tetrámeros cargados con alfa-gal ceramida, que agrupa todos los linfocitos NKT. Hasta el 45% de los linfocitos NKT reconocen a 44pept, que es compatible con la ausencia de polimorfismo a nivel de CDId y un polimorfismo muy limitado a nivel de receptor de linfocitos T NKT.

Figura 2

La inmunización de ratones con hemofilia A con péptidos restringidos a CDId provoca anticuerpos anti-factor VIII

Se inmunizaron ratones con hemofilia A 3 veces por vía subcutánea con 50 µg de una mezcla equimolar de péptidos de SEC ID1 (44pept) y péptido de SEC ID 2 (256pept) adsorbidos sobre hidróxido de aluminio. Un grupo de control recibió suero fisiológico en lugar de péptidos. Se tomó plasma 10 días después de la última inmunización y se valoró la presencia de anticuerpos anti-Factor VIII, usando un ensayo de unión directa. Brevemente, se insolubilizó el factor VIII (10 UI/ml) sobre placas de poliestireno, que se lavaron e incubaron con una dilución 1/10 de plasma. Después de un lavado adicional, se añadió un antisuero de cabra anti-ratón marcado con HRP, seguido de un sustrato enzimático. El desarrollo del color se leyó como DO.

La figura muestra que los ratones con hemofilia A inmunizados con péptidos de SEQ ID1 y de SEQ ID2 desarrollan anticuerpos contra el factor VIII.

Figura 3

Los ratones con hemofilia A reconstituidos con médula ósea de ratones CDId KO no producen anticuerpos contra el factor VIII

Se irradiaron letalmente ratones con hemofilia A y se reconstituyeron con la médula ósea de ratones CDId KO (5x10⁶ / ratón), que carecen de linfocitos NKT. Seis semanas después de la reconstitución de la médula ósea, los ratones recibieron 4 inyecciones IV de 2 UI/ml separadas por una semana. Se extrajo sangre a los ratones 10 días después

de la última inmunización y se ensayó el plasma para determinar la presencia de anticuerpos anti-factor VIII usando un ensayo de unión directa como se describe en la leyenda de la Figura 2. Se reconstituyó un grupo de control de ratones con hemofilia A irradiados con una médula ósea normal.

- 5 La figura indica que, aunque los ratones de control producen altas concentraciones de anticuerpos anti-FVIII después de la cuarta inyección de factor VIII (panel izquierdo), los ratones reconstituidos con la médula ósea de ratones con deficiencia de linfocitos NKT no lo hacen (panel derecho).

EJEMPLO 2: Vectores víricos de adenovirus 5

- 10 Los vectores víricos se usan comúnmente para terapia génica y vacunación génica. Uno de los vectores víricos más comunes deriva de adenovirus, serotipo 5. Los adenovirus (Ad) son virus sin envoltura que poseen un genoma de ADN bicatenario lineal de aproximadamente 35 kb. El Ad5 humano tiene una cápside que consiste en 3 proteínas estructurales principales: hexón, pentón y fibra. Se crean anticuerpos neutralizantes frente a proteínas hexón. Tales anticuerpos son muy comunes en seres humanos como consecuencia de una infección vírica. La presencia de tales anticuerpos bloquea la entrada del vector vírico y, en consecuencia, previene la expresión de la proteína transgénica portada por el vector. Los anticuerpos anti-Ad5 se generan en el transcurso de una respuesta adaptativa, que depende de la activación de linfocitos T CD4 + específicos de epítopos presentados en el contexto de moléculas de MHC de clase II.

- 20 Se sabe que Ad5 activa el sistema inmunitario innato, aunque el mecanismo preciso por el cual ocurre y la localización donde tiene lugar no están claros. Sin embargo, la activación del sistema inmunitario innato podría ser una etapa necesaria para neutralizar los anticuerpos que se van a formar.

- 25 Usando algoritmos, se identificaron 7 secuencias de aminoácidos que coinciden con el motivo general [FWTHY]-X₂X₃-[ILMV]-X₅X₆-[FWTHY] de una secuencia de unión a CDId (SEC ID 7, con motivos subrayados) en el hexón 6.

- Se inyectaron los ratones por vía intravenosa con 10⁹ UFP de vector de Ad5 en 3 ocasiones a intervalos de 10 días. Se prepararon entonces linfocitos T CD4 a partir del bazo mediante clasificación de perlas magnéticas. Se incubaron los linfocitos T CD4+ con tetrámeros de eCDId cargados con péptidos correspondientes a cada una de las 7 secuencias identificadas. Se mostró que una proporción significativa ($\pm 10\%$) de los linfocitos NKT CD4+ se marcaban mediante tetrámeros, lo que indica que las inyecciones del vector de Ad5 activaban linfocitos NKT específicos del péptido de la SEC ID7. Además, tales ratones produjeron anticuerpos específicos del isotipo IgG2a, característicos de neutralizar anticuerpos en el ratón.

- 35 Se preparó un vector vírico que contenía una sustitución de [FW] por serina S para cada una de las 7 secuencias de aminoácidos identificadas. Se usó este vector vírico mutado (de SEQ ID8, con motivos subrayados) para inmunizar animales según el mismo protocolo que se describe anteriormente para la secuencia natural. La proporción de linfocitos NKT valorada usando tetrámeros cargados con el péptido en secuencia natural (SEC ID7) era <1% y la concentración de anticuerpos específicos del virus Ad5 se reducía significativamente (hasta 10 veces).

Por lo tanto, se concluyó que la sustitución de F por S en cada localización P1 de motivos de unión a CDId era suficiente para reducir la activación de linfocitos NKT y reducir así la producción de anticuerpos anti-Ad5.

EJEMPLO 3: Proteínas genéticamente modificadas

- Las proteínas a las que los sujetos se exponen por inhalación o ingestión provocan con frecuencia reacciones no deseadas en sujetos predispuestos. El asma alérgica afecta a millones de personas en todo el mundo. La alergia a los alimentos, por otro lado, tiene una prevalencia global de $\pm 2,5\%$ en la población general. Los alérgenos ya sea aéreos, ingeridos o penetrantes de la piel, podrían compartir propiedades mediante las cuales activan linfocitos NKT.

- Uno de los alérgenos alimentarios más comunes es la manzana (*Malus domestica*), y la alergenidad es casi exclusivamente transmitida por la proteína Mal d 1, una proteína de 159 aminoácidos de longitud, que protege a la planta contra agentes infecciosos. Se identificó un motivo de secuencia usando algoritmos informáticos que corresponde al motivo general [FWTHY]-X₂X₃-[ILMV]-X₅X₆-[FWTHY] de una secuencia de unión a CDId.

EKLIESY correspondiente a los aminoácidos 144-150 de Mal d 1 (SEQ ID9).

- Se produjo por ingeniería genética una forma recombinante de Mal d 1 en la que F144 e Y150 se mutaron por S. La forma recombinante de Mal d 1 por lo tanto abarca un péptido de secuencia:

SKLIESS (SEQ ID10)

- Se produjeron péptidos sintéticos correspondientes a las SEQ ID9 y SEQ ID10. Se determinó su capacidad para activar linfocitos NKT in vitro usando células dendríticas humanas derivadas de monocitos de sangre periférica de un individuo sensibilizado ante Mal d 1. Se incubaron las células dendríticas cargadas con cada uno de los dos péptidos

en presencia de linfocitos NKT obtenidos del mismo individuo mediante clasificación de linfocitos periféricos usando marcadores específicos tales como CD4 y NKG2D. Se observó que los linfocitos NKT incubados con el péptido de SEQ ID9 activaban una proporción significativa de linfocitos NKT, mientras que el péptido mutado de SEQ ID10 no lo hacía. Además, los tetrámeros de CD1d humanos cargados con péptidos de SEQ ID9 se reconocieron por una proporción significativa de linfocitos NKT, pero los tetrámeros cargados con el péptido mutado de SEQ ID10 se reconocieron por menos del 1% de los linfocitos NKT.

Las dos mutaciones F144S e Y150S se introducen directamente en células clonales mediante mutagénesis dirigida a sitio. El organismo completo se produce entonces mediante estrategias de crecimiento convencionales. Las manzanas producidas por este OMG no provocan reacciones alérgicas.

Una aplicación específica de los péptidos o polipéptidos de la presente invención es en la enfermedad celíaca (intolerancia al gluten). Esta enfermedad se encuentra entre las más comunes en los seres humanos y está relacionada con la activación de linfocitos T frente a epítomos de gliadina que se presentan en el contexto de determinantes de MHC de clase II. Se ha descrito una susceptibilidad genética, estando los seres humanos portadores del determinante HLA-DQ2 o DQ8 de clase II predispuestos a la enfermedad. Estos determinantes de clase II presentan péptidos que han sido sometidos a desamidación por transglutaminasa. Sin embargo, estos eventos son el resultado de una reacción inflamatoria intestinal, probablemente relacionada con el sistema inmunitario innato.

Las gliadinas son monómeros de 250-300 residuos de aminoácidos. Una búsqueda del motivo general [FW]-XX-[ILM]-XX-[FWTHY] de una secuencia de unión a CDId usando algoritmos informáticos identificó tal secuencia (SEQ ID11, véase el listado de secuencias) en alfa-gliadina. Se produjo entonces una forma mutada de alfa-gliadina en la que el residuo F del motivo se sustituyó por un residuo S (SEQ ID 12, véase el apéndice).

Se siguió el mismo método que para Mal d 1 para mostrar que, aunque el polipéptido de SEC ID 11 activaba una proporción significativa de linfocitos NKT cuando se presentaba por células dendríticas presentadoras de antígeno, la forma mutada del polipéptido (SEC ID 12) no podía hacerlo. En cuanto a Mal d 1, los tetrámeros de CD1d humanos cargados con un péptido sintético que representa el motivo identificado en el polipéptido de

SEQ ID11 se reconocían por linfocitos NKT, mientras que los tetrámeros cargados con la forma mutada del motivo como se muestra en la SEC ID 12 no lo hacían.

La mutación se introdujo directamente en células clonales mediante mutagénesis dirigida a sitio. Se produjo entonces el organismo completo mediante estrategias de crecimiento convencionales. Los cereales que contienen la forma mutada de gliadina no provocan reacciones de intolerancia.

Debería ser obvio para los expertos en la materia que la presente invención también se puede aplicar a proteínas que se añaden, por ejemplo, a organismos genéticamente modificados para aumentar su resistencia a insecticidas, plaguicidas o cualquier otra modificación que se juzgue beneficiosa. Tales modificaciones conllevan el riesgo de crear nuevos motivos de unión a CD1d.

Son ejemplos adicionales de proteínas genéticamente modificadas con alergenicidad/inmunogenicidad reducidas:

- alérgenos alimentarios tales como soja, cacahuete y frutas de la familia de las rosáceas;
- proteínas lácteas;
- alérgenos transmitidos por el aire tales como látex (*Hevea brasiliensis*), pólenes de gramíneas tales como cizaña (*Lolium perenne*), fleo (*Phleum pratense*) o espiguilla (*Poa pratensis*);
- parvalbúmina de pescado;
- fosfolipasa A2 de abeja melífera.

También debe quedar claro para el experto en la materia que la invención se extiende a métodos mediante los cuales se producen péptidos o polipéptidos de la invención, incluyendo la producción de plantas y animales transgénicos.

EJEMPLO 4: Alérgeno Der p 1

Der p 1 es una cisteína proteasa que es el alérgeno principal del llamado ácaro del polvo doméstico (HDM), *D. pteronyssinus*. La sensibilización ante HDM es, con mucho, el desencadenante más común de asma y rinitis alérgicas en todo el mundo. Der p 1 contiene 3 motivos que coinciden con el motivo de unión a CDId general [FWTHY]-X₂X₃-[ILMV]-X₅X₆-[FWTHY], identificados usando algoritmos informáticos, y que son:

SEQ ID13: FSGVAAT, aminoácidos 38-44 de Der p 1

SEQ ID14: HSAIAAVI, aminoácidos 135-141 de Der p 1

SEQ ID15: YPYVVIL, aminoácidos 216-222 de Der p 1

Se sintetizaron los péptidos de SEQ ID 13, SEQ ID14 y SEQ ID 15 y se usaron para cargar tetrámeros de CD1d.

- 10 Se sometieron ratones BALB/c a la administración intranasal de Der p 1, usando 50 µl de solución salina que contenía 100 µg de Der p 1. Este método de exposición se repitió dos veces en tres días consecutivos con un intervalo de una semana. Los ratones se sacrificaron 5 días después de la última instilación nasal y se extirpó el bazo. Se purificaron los linfocitos T CD4+ por clasificación de perlas magnéticas y se incubaron en presencia de los tetrámeros de CD1d cargados con los péptidos de SEC ID 13, SEC ID 14 o SEC ID 15. Mediante determinación por
- 15 clasificador celular (facs) activado por fluorescencia, se observó que un porcentaje significativo de células ($\pm 10\%$) se tiñeron con los tetrámeros, identificándolos como linfocitos NKT CD4+. Por lo tanto, se concluyó que los péptidos de SEC ID13, SEC ID 14 y SEC ID 15 eran funcionales en la unión a CD1d y en el reconocimiento por linfocitos NKT.

- 20 Los linfocitos T CD4+ obtenidos a partir de los experimentos anteriores se incubaron en medio de cultivo en presencia de una célula presentadora de antígeno que expresa la molécula de CDId. Tales células están disponibles comercialmente, como por ejemplo las células JAWS2, que no expresan determinantes de MHC de clase II. Las células JAWS2 se cargaron con Der p 1 y se evaluó la presentación de los epítomos derivados de Der p 1 por CDId midiendo la producción de citocinas tales como IFN-gamma e IL-4 como marcadores de la activación de NKT. Se pudo observar que estaba presente una producción significativa de citocinas, lo que confirma que Der p 1 contenía
- 25 epítomos presentados por moléculas de CD1d.

- A continuación, se preparó una forma mutada de Der p 1 mediante ingeniería genética, en la que los 3 residuos de aminoácidos que se predice que están en posición P1 para la unión a CDId de los péptidos de SEC ID13, SEC ID 14 y SEC ID 15 se sustituyeron por serina. El Der p 1 mutado (SEQ ID16) se usó para la instilación nasal como se describe anteriormente con Der p 1 en secuencia natural (SEQ ID 17). En tal caso, no se observó unión significativa de esplenocitos de linfocitos T CD4+ cuando se incubó con los tetrámeros cargados con el péptido de SEC ID13, péptido de SEC ID14 o péptido de SEC ID 15, lo que indica que el Der p 1 mutado había perdido su capacidad de activar linfocitos NKT específicos de estos péptidos.

- 30 Además, se usó Der p 1 mutado (SEQ ID16) para cargar células JAWS2 y se probó su capacidad para activar linfocitos NKT. Para este experimento, se usaron linfocitos NKT tal como se obtuvieron de ratones inmunizados con Der p 1 en configuración natural o mutada. La producción de IFN-gamma e IL-4 se tomó como una indicación de la activación de NKT. Se observó que los linfocitos NKT obtenidos de ratones inmunizados con la secuencia natural de Der p 1 no se activaban cuando se incubaban en presencia de células JAWS2 cargadas con Der p 1 mutado.

- 40 Por lo tanto, se concluyó que Der p 1 en secuencia natural contenía epítomos de linfocitos T restringidos a CDId funcionales que activaban linfocitos NKT. Además, la eliminación de tales epítomos restringidos a CD1d funcionales por mutación era suficiente para eliminar la activación de linfocitos NKT.

45 EJEMPLO 5: Anticuerpos

- Los anticuerpos se usan como agentes terapéuticos en un gran número de indicaciones, desde enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide (p.ej., anticuerpos anti-TNF-alfa) o asma alérgica (p.ej., anticuerpos anti-IgE), hasta tumores (p. ej., anticuerpos anti-CD20). En la actualidad, se usan más de 120 anticuerpos terapéuticos para aplicaciones clínicas en diversas fases desde ensayos preclínicos hasta de fase III y se aceptan para la práctica clínica rutinaria.

- Los anticuerpos terapéuticos son quiméricos o totalmente humanizados, que contienen una secuencia de origen extraño solo en las regiones determinantes de complementariedad de las partes variables. Una minoría de tales anticuerpos derivan del repertorio humano y, como tales, se consideran como poco inmunogénicos. Sin embargo, los anticuerpos contra el anticuerpo terapéutico, incluso cuando derivan directamente del repertorio humano, se producen por la mayoría de los pacientes bajo tratamiento, con, en una proporción significativa de los casos, una producción de anticuerpos que neutralizan la actividad del agente terapéutico.

- 60 Se llevó a cabo una búsqueda de epítomos que coinciden con el motivo de unión a CD1d en la secuencia de anticuerpo de IgG humana usando algoritmos informáticos. Se identificó uno de tales motivos en la región CH2 (segundo dominio de la parte constante de la cadena pesada) de cada una de las 4 subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y se identificó un segundo motivo en el bucle CH3 de IgG1, IgG2 e IgG4:

- 65 SEQ ID18: YRVVSVL (CH2 de IgG1 e IgG4)

SEC ID19: FRVVSVL (CH2 de IgG2 e IgG3)

SEQ ID20: HEALHNH (Ibucle CH3 de IgG1, IgG2 e IgG4)

- 5 Se produjeron los péptidos sintéticos correspondientes a las SEQ ID18, SEQ ID 19 y SEQ ID20 y se usaron para cargar tetrámeros de CD1d humanos como en los ejemplos anteriores (véase, por ejemplo, el ejemplo 4 para alérgeno Der p 1). Se obtuvieron células de sangre periférica por punción venosa de pacientes que habían recibido una inyección de un anticuerpo terapéutico durante los 5 días anteriores. Se purificaron los linfocitos T CD4+ por clasificación de perlas magnéticas. Se incubaron entonces las células con tetrámeros cargados con los péptidos de
- 10 SEQ ID18, SEQ ID19 o SEQ ID20. El análisis por Facs identifica una proporción significativa de linfocitos NKT ($\pm 10\%$) marcados por tetrámeros.

- Los anticuerpos humanos monoclonales del isotipo IgG4 derivaban de linfocitos B de sangre periférica por transformación con el virus de Epstein-Barr. La secuencia genómica de tales anticuerpos se obtuvo a partir de
- 15 linfocitos B transformados. Se construyó un vector vírico que contenía la secuencia de ADNc correspondiente y se usó para la transfección de células CHO. Todos estos métodos son conocidos en la materia (véase por ejemplo, Jacquemin *et al.* Blood 92: 496-506, 1998).

- Los residuos de aminoácidos hidrófobos localizados en la posición 1 en los péptidos de SEQ ID18 y SEQ ID20 se
- 20 mutaron a una serina y se produjo el anticuerpo mutado por células CHO transfectadas.

- Los linfocitos T CD4+ de sangre periférica obtenidos como anteriormente se expusieron en medio de cultivo a células dendríticas humanas (derivadas de monocitos de sangre periférica humana mediante métodos conocidos en la materia) y se cargaron con el anticuerpo en configuración natural (SEQ ID21) o su homólogo mutado (SEQ ID22).
- 25 Después de cultivar las células con linfocitos T CD4+ durante 5 a 7 días, se evaluó la población de linfocitos T CD4+ activados por anticuerpo natural o mutado. Se separaron los linfocitos NKT CD4+ de los linfocitos T CD4+ usando un anticuerpo de NKG2D, un marcador de superficie asociado solo con linfocitos NK o NKT.

- Se observó que los linfocitos T CD4+ y los linfocitos NKT se activaban cuando se usaba el anticuerpo en secuencia
- 30 natural (SEQ ID21), mientras que la forma mutada del anticuerpo (SEQ ID22) solo activaba los linfocitos T CD4+ restringidos a la clase II y no los linfocitos NKT.

- Se concluyó que los anticuerpos de IgG humanos contenían epítopos correspondientes al motivo [FWTHY]-X₂X₃-[ILMV]-X₅X₆-[FWTHY], que tienen la capacidad de reconocerse por y activar linfocitos NKT. Además, la mutación de
- 35 residuos de aminoácidos hidrófobos clave dentro de tal motivo era suficiente para prevenir la activación de linfocitos NKT.

- Debe entenderse que los ejemplos proporcionados aquí no son exhaustivos y que pueden concebirse combinaciones de proteínas o péptidos que contienen diversos números de sustituciones o deleciones de
- 40 aminoácidos. Por ejemplo, en el ejemplo 1, se pueden delimitar diversas combinaciones de sustitución de aminoácidos hidrófobos.

Listados de secuencias

45 SEQ ID1

Aminoácidos 309-315 del factor VIII (humano)

FCHISSH

50

SEQ ID2

Aminoácidos 1816-1822 del factor VIII (humano)

55 FWKVQHH

SEQ ID3

Aminoácidos 1918-1924 del factor VIII (humano)

60

FHAINGY

SEQ ID4

65 Dominio del factor A1 (mutaciones F309S y H315S subrayadas) (humano)

ES 2 663 862 T3

1 ATRRRYY LGAVELSWDYMQSDLGELP VDAR FPP RV P K S FPF
41 NTS VVYKKT LFVE F T VHLFNI AKPR P PWMGLLGPTI QA EV
81 YDT VVITLKNMASHPVSLHAVGVS Y W K ASEGAEYDDQTSQ
121 REK EDDK VFPGGSHTYVWQVLKE N G P MASDPLCLTYSYLS
161 HVD LVK DLNSGLIG AL LVCRE GSLA K E KTQ TL HKFILLFA
201 VFD EGKSWHSE TKN SLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
241 SLP GLIGCH R KSV YWH VIG MGTT PEV HSIF LEG HTFL VRN
281 HRQ AS LEI SPIT FLT AQTLLM DL GQFL LSC HIS SS QH DGM
321 EAY VKV DS CPEEP QLRMKNNE EAED YDDDLTDSEMDVVRF
361 D DDN SPSFI Q IRSVA KK HPKTW VHYIA AEEEDW DYAP LVL
401 APDDR SYKS QYLN NGPQ RIGRK YKK VRF MAYT DETFKTRE
441 AIQ H ES G ILGPLLYGE VG D TLL II FK NQ AS RP YNI YP H GI
481 TD VR PLYSR R LPK GVKHLK DFP ILP GEIFK YK WTV TVEDG
521 PTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASG

SEQ ID5

5 Dominio A3 del factor VIII (mutaciones F1816S y H1822S subrayadas) (humano)

1637 SQNPPVLKRHQREITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKED
1677 FDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPH
1717 VLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL
1757 GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQR

1798 QGAEPKRNFKPNETKTYSWKVQHSMAPTKDEFDCKAW

1836 AYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQE

1876 FALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKEN

1916 YRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHS

1956 IHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGI

1996 WRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDF

2036 QITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDL

2076 LAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTY

2116 RGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIARYIRLHPTH

2156 YSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSY

2196 FTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQ

2236 KTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFF

2276 QNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH

2316 QIALRMEVLGCEAQDLY*

SEQ ID6

5 Factor VIII (mutaciones F309S, H315S, F1816S y F1918S subrayadas) (humano)

ATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPFNTSVVYKCTL

FVEFTVHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLSHA

VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD

PLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFA

VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR

KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLSCHISSQHHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
PLLYGEVGD²TLLIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD
FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQ²RG²NQIMSDKRN²VILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTD²FLS
VFFSGYT²FKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF²SQNSRHPS
TRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTP
HGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNLS²EMTHFRPQLHHSGDMVFT
PESGLQLRLNEKLGT²TAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDN
TSSLGPPSMPVHYDSQLD²TTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEEN²ND²SKLLES
GLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKT
NKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRM
LMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDM²SFFKML
FLPESARWIQ²RTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKV

VVGKGFEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEK

KETLIQENVVLPQIHTVTGKNFMKNLFLSTRQNVESYEGAYAPVLQD

FRSLNDSTNRKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPN

TSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPS

TLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIR

PIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTL

EMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHI

YQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVA

TESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEK SPEKTAFKKKDTILS

LNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLC SQNPPVLKRHQREI

TRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI

AAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG

ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGA

EPRKNFVKPNETKTYSWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG

LIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR

APCNIQMEDPTFKENYRSHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSN

ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVEC

LIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKL

ARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ
 FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIR
 LHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF
 ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKS
 LLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDP
 LLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY*GWPLQHLPLPSPLPPQL
 QGSVPPWLA FYLCAKS*Q TLP*SLL

SEQ ID7

- 5 Hexón, adenovirus humano 5, (motivos de unión a CD1d subrayados): (virus)

MATPSMMPQWSYMHISGQDASEYLSPLGVQFARATETYFSLNNKFRNPTVAPTHDV
 TTDRSQRLTLRFIPVDREDA
 YSYKARFTLAVGDNRVLDMASTSFDIRGVLDRGPTFKPYSGTAYNALAPKGAPNPCE
 WDEAATALEINLEEEDDDNE
 DEVDEQAEQQKTHVFGQAPYSGINITKEGIQIGVEGQTPKYADKTFQPEPQIGESQWY
 ETEINHAAGRVLKKTTPMK
 PCYGSYAKPTNENGGQGILVKQNGKLESQVEMQFFSTTEAAAGNGDNLTPKVVLY
 SEDVDIETPDTHISYMP TIKE
 GNSRELMGQQSMPNRPNYIAFRDNFIGLMYYNSTGNMGVLAGQASQLNAVVDLQD
 RNTELSYQLLLDSIGDRTRYFS
 MWKQAVDSYDPDVRIIENHGTEDELPNYCFPLGGVINTETLTKVKPKTGQENGWEK
 DATEFSKNEIRVGNNFAMEI
 NLNANLWRNFLYSNIALYLPDKLKYSPSNVKISDNPN TYDYMNKR VVAPGLVDCYI
 NLGARWSLDYMDNVNPFNHHR
 NAGLRYRSMLLGNGRYVPFHQVPQKFFAIKNLLLLPGSYTYEWNFRKDVNMVLQSS
 LGNDLRVDGASIKFDSICLY
 ATFFPMAHNTASTLEAMLRNDTNDQSFNDYLSAANMLYPIPANATNPISIPSRNWA
 AFRGWAFTRLKTKETPSLGS
 GYDPYYTYSGSIPYLDGTFYLNHTEKKVAITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDG
 EGYNVAQCNMTKDWFLVQM
LANYNIGYQGFYIPESYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDDTKYKDYQQVGILHQHNNS

GFVGYLAPTMREGQAYPANFP
YPLIGKTAVDSITQKKFLCDRTLWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNLLYANSAHALDMT
FEVDPMDEPTLLYVLFEVD
VVRVHRPHRGVIETVYL RTPFSAGNATT

SEQ ID8

- 5 Hexón, adenovirus humano 5 (mutaciones de residuo de anclaje P1 subrayadas): (virus)

MATPSMMPQWSYMHISGQDASEYLSPLGVQFARATETSFSLNNKFRNPTVAPTHDV
TTDRSQRLTLRFIPVDREDA
YSYKARFTLAVGDNRVLDMASTSFDIRGVLDRGPTFKPYSGTASNALAPKGAPNPCE
WDEAATALEINLEEEDDDNE
DEVDEQAEQQKTHVFGQAPSSGINITKEGIQIGVEGQTPKYADKTFQPEPQIGESQWY
ETEINHAAGRVLKKTTPMK
PCYGSYAKPTNENGQGGILVKQQNGKLESQVEMQFFSTTEAAAGNGDNLTPKVVLV
SEVDIETPDTHISYMP^{TIKE}
GNSRELMGQQSMPNRPNYIAFRDNSIGLMYYNSTGNMGVLAGQASQLNAVVDLQD
RNTELSYQLLLDSIGDRTRYFS
MWKQAVDSYDPDVRIIENHGTEDELPNYCFPLGGVINTETLTKVKPKTGQENGWEK
DATEFSKNEIRVGNNFAMEI
NLNANLWRNFLSSNIALYLPDKLKYS^{SPSNVKISDN}PNTYDYMNKR^{VV}APGLVDCYIN
LGARWSLDYMDNVNPFNHHR
NAGLRSRSMLLGNGRYVPFSIQVPQKSFAIKNLLLLPGSYTYEWNFRKDVNMVLQSS
LGNDLRVDGASIKSDSICLY
ATFFPMAHNTASTLEAMLRNDTNDQSFNDYLSAANMLYPIPANATNPISIPSRNWA
AFRGWASTRLKTKETPSLGS
GYDPYYTYSGSIPYLDGTFYLNHTSKKVAITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDG
EGYNVAQCNMTKDSFLVQM
LANYNIGYQGFYIPESYKDRMYSFFRN^{FQPM}SRQVDDTKYKDSQQVGILHQHNNS
GFVGYLAPTMREGQAYPANFP
SPLIGKTAVDSITQKKFLCDRTLWRIPFSSNSMSMGALTDLGQNLLYANSAHALDMT
FEVDPMDEPTLLYVLFEVSD
VVRVHRPSRGVIETVYL RTPFSAGNATT

- 10 SEQ ID9

Mal d 1, Malus domesticus, aminoácidos 144-150

- 15 FKLIESY

SEQ ID10

Mal d 1, Malus domesticus, mutaciones F144S y Y150S subrayadas (vegetal)

- 20 SKLIESS

SEQ ID11

Alfa-gliadina (motivo de unión a CD1d subrayado)

5 MVRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQFPGQQQPFPPQQPYPQPQPFPSQQPYL
QLQPFPPQQLPYPQPQLPY
PQPQLPYPQPQPFPPQQPYPQSQPQYSQPQQPISQQQQQQQQQQQQKQQQQQQQQIL
QQILQQQLIPCRDVVLQQH
SIAYGSSQVLQQSTYQLVQQLCCQQLWQIPEQSRCQAIHNVVHAILHQQQQQQQQQ
QQQPLSQVSFQQPQQQYPS
GQGSFQPSQQNPQAQGSVQPQQLPQEEIRNLALETLPAMCNVYIPPYCTIAPVGIFGT
NYR

10 SEQ ID12

Alfa-gliadina (mutación subrayada)

MVRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQFPGQQQPFPPQQPYPQPQPFPSQQPSL
QLQPFPPQQLPYPQPQLPY
PQPQLPYPQPQPFPPQQPYPQSQPQYSQPQQPISQQQQQQQQQQQQKQQQQQQQQIL
QQILQQQLIPCRDVVLQQH
SIAYGSSQVLQQSTSQLVQQLCCQQLWQIPEQSRCQAISNVVHAILHQQQQQQQQQ
QQQPLSQVSFQQPQQQYPS
GQGSFQPSQQNPQAQGSVQPQQLPQEEIRNLALETLPAMCNVYIPPSCTIAPVGIFGT
NYR

15 SEQ ID13

Der p 1 de D. pteronyssinus, aminoácidos 38-44 (Pyroglyphidae, Dermatophagoides pteronyssinus, ácaro del polvo doméstico europeo)

20 FSGVAAT

SEQ ID14

25 Der p 1 de D. pteronyssinus, aminoácidos 135-141 (Pyroglyphidae, Dermatophagoides pteronyssinus, ácaro del polvo doméstico europeo)

HSAIAAVI

30 SEQ ID15

Der p1 de D. pteronyssinus, aminoácidos 216-222 (Pyroglyphidae, Dermatophagoides pteronyssinus, ácaro del polvo doméstico europeo)

35 YPYVVIL

SEQ ID16

40 Der p 1 maduro (mutaciones de los residuos de anclaje P1 F38S, H135S y Y216S subrayados) (Pyroglyphidae, Dermatophagoides pteronyssinus, ácaro del polvo doméstico europeo)

ETNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWASSGVAATESAYLAYRNQSLD
 LAEQELVDCASQHGCHGDTI
 PRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQT
SSAIAVIIIGIKDLDAFRHY
 DGRTHIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAANI
 DLMMIEESPYVVIL

SEQ ID17

- 5 Der p 1 maduro (epítomos de CD1d subrayados): (Pyroglyphidae, Dermatophagoides pteronyssinus, ácaro del polvo doméstico europeo)

ETNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAESGVAATESAYLAYRNQSLD
 LAEQELVDCASQHGCHGDTI
 PRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQT
HSAIAVIIIGIKDLDAFRHY
 DGRTHIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAANI
 DLMMIEEYPYVVIL

10 SEQ ID18

Anticuerpo de IgG, dominio CH2 de IgG1 e IgG4 (humano)

YRVVSVL

15 SEQ ID19

Anticuerpo de IgG, dominio CH2 de IgG2 e IgG3 (humano)

20 SEQ ID20

Anticuerpo de IgG, dominio CH3 de IgG1, IgG2 e IgG4 (humano)

25 SEQ ID21

HEALHNNH

- 30 Fragmento FC de IgG4 humano (epítomos de CD1d subrayados) (humano)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSL
 GTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSQEDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 YSRLTVDKSRWQEGNVFS
 CSVMHEALHNNHYTKSLSLSLKG

SEQ ID22

Fragmento FC de IgG4 humano (aminoácidos mutados subrayados) (humano)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMSEALHNHYTQKSLSLGLGK

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un péptido o polipéptido aislado modificado con capacidad reducida para activar linfocitos NKT que comprende las etapas de:
- 5 a. identificación de al menos un epítipo de linfocitos NKT restringido a CD1d dentro de la secuencia natural de aminoácidos de dicho péptido, en el que dicho epítipo comprende el motivo [FWTHY]-X₂X₃-[ILMV]-X₅X₆-[FWTHY] con residuos de aminoácido hidrófobos en la posición P1 y/o P7
- 10 b. eliminación de al menos un epítipo de NKT restringido a CD1d mediante la sustitución o delección de al menos un residuo de aminoácido hidrófobo en la posición P1 y/o P7 por un residuo no hidrófobo o mediante la adición de al menos un aminoácido en cualquier localización dentro de dicho epítipo.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que la eliminación de dicho epítipo o epítopos de linfocitos NKT restringidos a CD1d ocurre sustituyendo al menos un residuo de aminoácido hidrófobo en la posición P1 y/o P7 por un residuo no hidrófobo.
- 20 3. El método según la reivindicación 2, en el que al menos un F, W, T, H, Y en posición P1 y/o P7 se reemplaza por al menos uno cualquiera de aminoácido natural, aminoácido no natural o compuesto de aminoácidos no aromáticos, en el que dicho aminoácido es diferente de F, W, T, H, Y.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la eliminación de dicho epítipo o epítopos restringidos a CD1d incluye adicionalmente la sustitución o delección de un residuo alifático en P4.
- 25 5. Método según la reivindicación 4 caracterizado porque dicho residuo alifático en P4 es I, L o M.
6. Un polipéptido aislado obtenible según las reivindicaciones 1 a 5 y que comprende la SEQ.ID.NO:4.

Figura 1

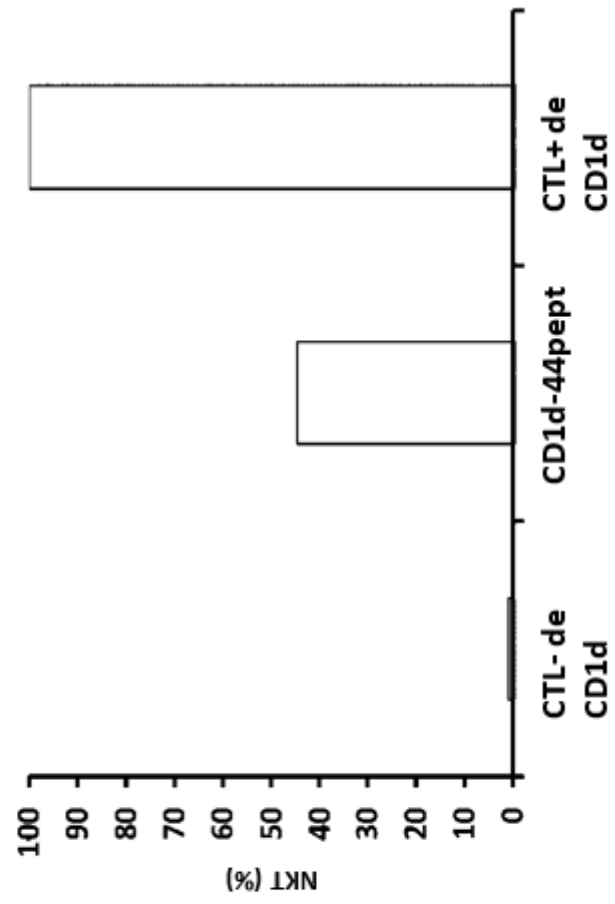


Figura 2

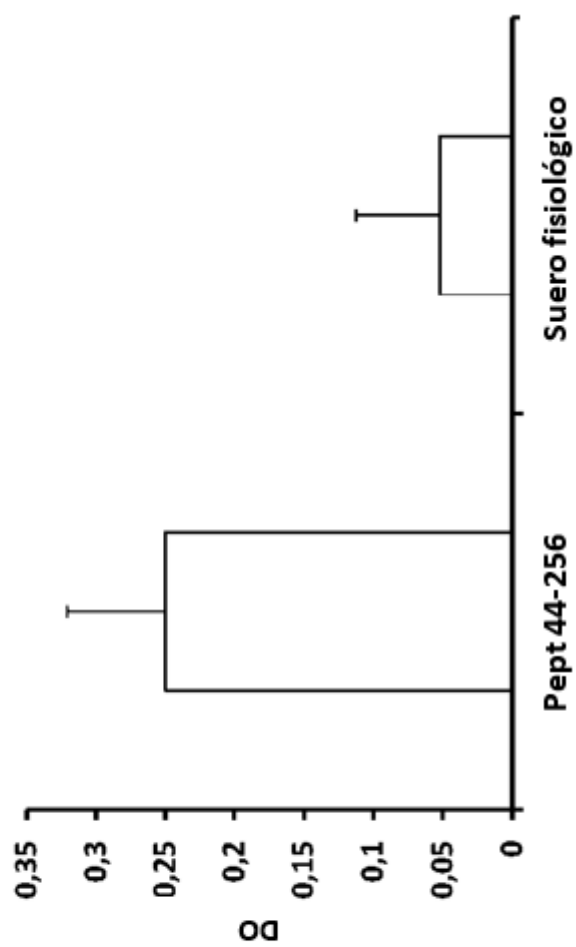


Figura 3

