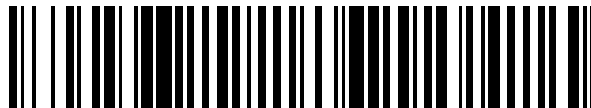


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 386**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2016** E 16169520 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018** EP 3096138

54 Título: **Modelos animales novedosos para evaluar compuestos farmacéuticos**

30 Prioridad:

18.05.2015 EP 15167964

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

28.02.2019

73 Titular/es:

**IMCYSE SA (100.0%)
GIGA B34 Avenue de l'Hôpital 1
4000 Liège, BE**

72 Inventor/es:

**SAINT-REMY, JEAN-MARIE;
VANDER ELST, LUC y
CARLIER, VINCENT**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 702 386 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

Modelos animales novedosos para evaluar compuestos farmacéuticos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos por los que animales se pueden hacer insensibles a compuestos farmacéuticos únicos con propiedades antigénicas que se pueden evaluar en estos modelos animales para propiedades farmacocinéticas y toxicidad.

10 La invención se refiere además al uso de tales animales para evaluar las propiedades farmacocinéticas y la toxicidad de compuestos farmacéuticos. La invención también se refiere a animales que se han hecho específicamente insensibles a estos compuestos farmacéuticos.

15 **Antecedentes de la invención**

Cada año se ensayan miles de compuestos farmacéuticos para propiedades farmacocinéticas y potencial toxicidad antes del uso clínico. Una gran parte de estas pruebas se realiza administrando un compuesto farmacéutico a un animal y evaluando las propiedades farmacocinéticas y/o toxicidad en varios puntos en el tiempo. Sin embargo, estos estudios están gravemente limitados por el hecho de que la gran mayoría de los compuestos farmacéuticos provocan una respuesta inmunitaria. Tal respuesta inmunitaria es habitualmente rápida, produciéndose en días o semanas, lo que reduce drásticamente de esta manera el periodo de tiempo durante el que un animal se puede observar para evaluar las propiedades farmacocinéticas y posible toxicidad de los compuestos farmacéuticos. Obviamente, la respuesta inmunitaria también excluye cualquier readministración de los compuestos farmacéuticos.

25 La naturaleza de una respuesta inmunitaria puede variar, desde la inducción de anticuerpos al desarrollo de una respuesta celular, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del antígeno, el contexto genético del animal, la vía, las dosis y la frecuencia de administración. Sin embargo, tal respuesta inmunitaria depende del reconocimiento del antígeno por los linfocitos y la activación de estas células, que pertenecen al subconjunto CD4+. Una vez activadas, las células T CD4+ dictan la forma y el destino de la respuesta a múltiples niveles incluyendo, aunque sin limitación, activación de inmunidad innata, activación de células B para madurar y producir anticuerpos específicos, aumento de la capacidad de las células presentadoras de antígenos para activar células T CD8+, reclutamiento y activación de células T CD4+ indiferenciadas y activación de inmunidad celular tal como respuesta de tipo retrasado, como se observa con sustancias químicas.

35 Considerando el papel central de las células T CD4+ en todos estos procesos, un método mediante el cual fuera factible prevenir y/o suprimir específicamente su activación proporcionaría un estado muy específico de tolerancia inmunitaria al compuesto farmacéutico en evaluación (proteína o compuesto orgánico no proteico).

40 La solicitud de patente WO2008017517 describe epítopos restringidos a clase II a los que se añade un motivo oxidorreductasa en los residuos que flanquean la secuencia de aminoácidos que se ajusta a la hendidura del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. La inclusión de un motivo oxidorreductasa convierte una célula T CD4+ efectora en una célula citolítica potente, que induce apoptosis de la célula presentadora de antígeno con la que se ha formado una sinapsis, previniendo de esta manera la activación de células efectoras de inmunidad adaptativa. Este concepto se elabora adicionalmente para alofactores solubles (documento WO2009101206), patógenos intracelulares (documento WO2009101208) y antígenos asociados a tumores (documento WO2009101205).

50 La solicitud de patente WO2012069568 describe epítopos peptídicos de células T restringidos a CD1d a los que se ha añadido un motivo oxidorreductasa en los residuos que flanquean la secuencia. Tal péptido convierte células NKT en células citolíticas fuertes que eliminan la célula presentadora de antígeno con la que se forma una sinapsis, previniendo de esta manera la activación de células efectoras de inmunidad innata.

Las publicaciones anteriores describen métodos de prevención en donde animales sanos se tratan con un péptido con motivo redox y epítipo de un patógeno, alérgeno, o autoantígeno y posteriormente se exponen con el agente que produce la enfermedad.

55 Las publicaciones anteriores describen métodos de tratamiento en donde animales enfermos (o modelos para tal enfermedad) se tratan con un péptido con motivo redox y un epítipo de una proteína terapéutica para prevenir una respuesta inmunitaria posterior a esta proteína terapéutica.

60 **Compendio de la invención**

Como un concepto general de la presente invención, se ensayan compuestos farmacéuticos para enfermedades o trastornos en organismos modelo en donde el compuesto farmacéutico no tiene efecto medicinal, porque el compuesto se administra a un animal sano, es decir, un animal sin síntomas o signos, o que no padece la enfermedad para la que se pretende el fármaco.

Los modelos de la presente invención se diferencian del estado de la técnica descrito anteriormente en que los animales sanos se hacen tolerantes contra un compuesto farmacéutico, y que posteriormente el compuesto farmacéutico se administra a este animal sano.

5 La presente invención, por tanto, se refiere a métodos para obtener animales tolerantes específicos de antígenos, los animales y su uso para evaluar las propiedades farmacocinéticas y la toxicidad de compuestos farmacéuticos.

10 La presente invención tiene la ventaja de que el periodo de tiempo durante el que un animal se puede observar para evaluar las propiedades farmacocinéticas y posible toxicidad de compuestos farmacéuticos, será durante un periodo mucho más largo que los habituales pocos días o semanas en donde se produce respuesta inmunitaria en animales normales. La presente invención proporciona la ventaja adicional de que la readministración de compuestos farmacéuticos se puede realizar en animales de prueba.

15 Los métodos de la presente invención tienen la ventaja de que la respuesta inmunitaria a un compuesto se elimina en un animal sin afectar la reactividad inmunitaria global.

20 La presente invención se extiende además a animales directamente obtenidos por los métodos de la presente invención.

Un aspecto de la presente invención se refiere a métodos para determinar un parámetro de un compuesto farmacéutico contra una enfermedad o trastorno. Estos métodos comprenden las etapas de:

- 25 - proporcionar un animal no humano que no padece o no muestra síntomas o signos de este trastorno y que no provoca un respuesta inmunitaria contra este compuesto farmacéutico, por lo cual el animal es obtenible mediante la administración de un péptido que comprende un motivo oxidorreductasa con la secuencia [CTS]-x-x-C [SEQ ID NO: 8] o [C]-x-x-[CTS] [SEQ ID NO: 9] y que comprende además un epítipo peptídico de NKT o un epítipo de células T de MHC de clase II de este compuesto farmacéutico, en donde el motivo y el epítipo están separados por un enlazador de entre 0 y 4 aminoácidos,
- 30 - administrar el compuesto farmacéutico al animal no humano,
- medir un parámetro del compuesto farmacéutico en el animal no humano.

35 En formas de realización en el presente documento el compuesto farmacéutico es una proteína y la secuencia de epítipo es un fragmento de esta proteína.

En formas de realización más específicas, el compuesto farmacéutico es una proteína con un epítipo dependiente de conformación y la secuencia del epítipo es un mimótopo de este epítipo dependiente de conformación.

40 En otras formas de realización el compuesto farmacéutico es no proteico y la secuencia del epítipo es la secuencia de un mimótopo para dicho compuesto farmacéutico.

En formas de realización específicas de los métodos el motivo es C-x-x-C [SEQ ID NO: 10].

45 En formas de realización específicas de los métodos el epítipo peptídico de NKT tiene el motivo [FWTHY]-X₂-X₃-[ILMV]-X₅-X₆-[FWTHY] [SEQ ID NO: 11].

En formas de realización específicas de los métodos el animal no es un primate, por ejemplo, un roedor.

50 En formas de realización específicas de los métodos el animal es un animal exogámico.

En formas de realización de estos métodos el parámetro se selecciona de uno o más del grupo consistente en toxicidad, tiempo de semivida, peso corporal, movilidad, hábitos de alimentación, respiración, micción y deposición de heces, aspecto de la piel, etc.

55 Otro aspecto de la invención referido a métodos no terapéuticos para hacer un animal no humano no respondedor a una respuesta inmunitaria contra un compuesto farmacéutico contra una enfermedad o trastorno que comprende las etapas de:

- 60 - proporcionar un animal no humano que no padece o no muestra síntomas o signos de esta enfermedad o trastorno y que no ha recibido este compuesto farmacéutico,
- administrar un péptido que comprende:
- un motivo oxidorreductasa con la secuencia [CTS]-x-x-C [SEQ ID NO: 8] o [C]-x-x-[CTS] [SEQ ID NO: 9], y
- un epítipo peptídico de NKT o un epítipo de células T de MHC de clase II de este compuesto farmacéutico, en donde el motivo y el epítipo están separados por un enlazador de entre 0 y 4 aminoácidos.

65

Otro aspecto se refiere a animales no humanos, que son no respondedores a una respuesta inmunitaria contra un compuesto farmacéutico contra una enfermedad o trastorno, obtenibles por los métodos anteriores.

5 Otro aspecto se refiere al uso de tal animal no humano en ensayos de toxicidad de un fármaco, o en determinar un parámetro farmacocinético de un fármaco.

Definiciones

10 “**Compuestos farmacéuticos**” en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier compuesto con actividad médica beneficiosa demostrada o esperada que puede provocar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos en el presente documento son péptidos y proteínas, así como sustancias químicas pequeñas. Tales sustancias químicas pequeñas se unen a proteínas del animal huésped tal como albúmina y pueden actuar como un hapteno en desencadenar una respuesta inmunitaria.

15 “**Animal sano**” se refiere a animales de tipo salvaje o cepas de laboratorio consanguíneas, y esto en relación al compuesto farmacéutico que se prueba en los métodos de la presente invención.

20 El estado saludable del animal con respecto al compuesto farmacéutico en investigación para una enfermedad o trastorno implica que el animal no tiene el malestar producido por esta enfermedad y no muestra los síntomas o signos producidos por esta enfermedad o trastorno.

Por tanto, los animales pueden tener trastornos o enfermedades diferentes de la que se trata mediante el compuesto farmacéutico en investigación.

25 Cuando el animal es un animal transgénico, el transgén no está relacionado con respecto a la patología que se trata mediante el compuesto farmacéutico.

30 Así, por ejemplo, un anticoagulante no se prueba en un animal con heridas infligidas o en donde se administran inhibidores de la coagulación. De forma similar, un anticoagulante no se prueba en un animal con un transgén (esp. eliminado) para un componente de la ruta de coagulación.

35 El término “**péptido**” o “**proteína**” cuando se usa en el presente documento se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 2 aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos, pero que puede en una forma de realización particular comprender estructuras no aminoacídicas (como, por ejemplo, un compuesto orgánico de unión). 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 de péptidos química o por modificación química o enzimática, así como extremos carboxi y/o amino modificados.

40 La diferencia entre péptidos y proteínas se hace principalmente de forma arbitraria en la técnica mediante lo cual los péptidos son típicamente menores de 50 aminoácidos y las proteínas mayores de 50 aminoácidos.

45 En el contexto de la presente invención, la combinación del motivo redox y uno o más epítomos en un polipéptido se denominará como “péptido” aunque la longitud puede variar desde 12, hasta 20, 25, 30, 40, 50, 75 o hasta 100 aminoácidos. Los compuestos farmacéuticos con enlaces peptídicos pueden ser tan pequeños como 4-10 aminoácidos para ciertas hormonas peptídicas (con frecuencia con modificaciones postraduccionales) en un extremo, hasta grandes complejos proteicos de más de 100 aminoácidos tal como anticuerpos terapéuticos en la otra parte.

50 “**Parámetro farmacocinético**” en la presente invención se refiere a propiedades tales como tiempo de semivida, absorción en tipos celulares o tejidos específicos, metabolismo a otros compuestos. Otros parámetros que se pueden ensayar son parámetros de comportamiento, físicos y clínicos tal como peso corporal, movilidad, hábitos de alimentación, respiración, micción y deposición de heces, aspecto de la piel.

55 El término “**epítopo**” cuando se usa en el presente documento se refiere a una o varias partes (que pueden definir un epítopo conformacional) de una proteína que es/son específicamente reconocida(s) y unida(s) por un anticuerpo o una parte del mismo (Fab', Fab2, etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de linfocitos B o T, y que es capaz, mediante esta unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

60 El término “**antígeno**” cuando se usa en el presente documento se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más hapteno(s) y/o que comprende uno o más epítomos de células T. Típicamente, esta macromolécula es una proteína o péptido (con o sin polisacáridos) y comprende uno o más epítomos; tal macromolécula puede en el presente documento denominarse alternativamente “**proteína antigénica**” o “**péptido antigénico**”. El término “**hapteno**” cuando se usa en el presente documento se refiere a una molécula pequeña que solo puede inducir una respuesta inmunitaria cuando está unida a una proteína soporte, sea exógena o endógena.

65 El término “**inmunógeno**” cuando se usa en el presente documento se refiere a una molécula que puede estimular una respuesta inmunitaria celular o humoral.

- 5 El término “**epítipo de célula T**” o “**epítipo de linfocito T**” en el contexto de la presente invención se refiere a un epítipo de célula T dominante, subdominante o menor, es decir, una parte de una proteína antigénica que es específicamente reconocida y unida por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. Si un epítipo es dominante, subdominante o menor depende de la reacción inmunitaria provocada contra el epítipo. La dominancia depende de la frecuencia a la que tales epítopos son reconocidos por células T y capaces de activarlos, entre todos los posibles epítopos de células T de una proteína. En particular, un epítipo de célula T es un epítipo unido por moléculas de MHC de clase I o MHC de clase II.
- 10 El término “**epítipo peptídico de célula NKT**” se refiere a una parte de una proteína antigénica que es específicamente reconocida y unida por un receptor en la superficie de un linfocito T. En particular, un epítipo peptídico de células NKT es un epítipo unido por moléculas CD1d, con el motivo [FWTHY]-X₂-X₃-[LMV]-X₅-X₆-[FWTHY] [SEQ ID NO: 11] o una forma más restrictiva de la misma como se explica más adelante.
- 15 El término “**células efectoras CD4+**” se refiere a células que pertenecen al subconjunto CD4-positivo de células T cuya función es proporcionar ayuda a otras células, tal como, por ejemplo, células B. Estas células efectoras se describen convencionalmente como células Th (por células T auxiliares, ‘*helper*’), con diferentes subconjuntos tal como células Th0, Th1, Th2 y Th17.
- 20 El término “**células NKT**” se refiere a células del sistema inmunitario innato caracterizadas por el hecho de que portan receptores tal como NK1.1 y NKG2D, y reconocen epítopos peptídicos presentados por la molécula CD1d. En el contexto de la presente invención, las células NKT pueden pertenecer o bien al subconjunto de tipo 1 (invariante) o de tipo 2, o a cualquiera de las células NKT menos caracterizadas con receptores de células T más polimórficos que las células de tipo 1 o tipo 2.
- 25 La “**molécula CD1d**” se refiere a una molécula no derivada del MHC hecha de 3 cadenas alfa y un conjunto antiparalelo de cadenas beta organizadas en un surco hidrofóbico profundo abierto en ambos lados y capaz de presentar lípidos, glucolípidos o péptidos hidrofóbicos a las células NKT.
- 30 El término “**trastornos inmunitarios**” o “**enfermedades inmunitarias**” se refiere a enfermedades en donde una reacción del sistema inmunitario es responsable de o sostiene un mal funcionamiento o situación no fisiológica en un organismo. Los trastornos inmunitarios en el contexto de la presente invención se refieren a patología inducida por agentes infecciosos y vigilancia tumoral.
- 35 El término “**alofactor**” se refiere a una proteína, péptido o factor (es decir, cualquier molécula) que muestra 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.
- 40 El término “**aloantígeno**” o “**antígeno aloinjerto**” cuando se usa en el presente documento se refiere a un antígeno derivado de (liberado de y/o presente en) una célula o tejido que, cuando se transfiere de un donante a un receptor, puede ser reconocido y unido por un anticuerpo o receptor de células B o T del receptor. Los aloantígenos típicamente son productos de genes polimórficos. Un aloantígeno es una proteína o péptido que, cuando se compara entre donante y receptor (pertenecientes a la misma especie), muestra pequeñas diferencias estructurales. La presencia de tal antígeno del donante en el cuerpo de un receptor puede provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. Tal respuesta inmunitaria alorreactiva es específica para el aloantígeno.
- 45 El término “**motivo tiol-oxidoreductasa**”, “**oxidoreductasa**”, “**motivo tiorreductasa**”, “**motivo “tiorredox”**” o “**motivo redox**” se usan aquí como términos sinónimos y se refiere al motivo de secuencia C-X-X-[CTS] [SEQ ID NO: 9] o [CTS]-X-X-C [SEQ ID NO: 8], en el que C representa cisteína, S serina, T treonina y X cualquier aminoácido.

50 Descripción detallada

Miles de nuevas moléculas se consideran para uso en terapia y como tal se prueban su eficacia, propiedades farmacocinéticas y su potencial toxicidad en modelos animales. Los roedores, incluyendo ratones, ratas y cobayas son los modelos usados con mayor frecuencia por su facilidad de uso, disponibilidad de cepas singénicas y de herramientas de evaluación. Otros modelos animales incluyen conejos, cerdos, perros y caballos. Estos animales divergen mucho de los seres humanos en términos de capacidad para montar una respuesta inmunitaria contra una molécula considerada para terapia y con mucha frecuencia hacen una respuesta temprana que no tiene ninguna relevancia para la patofisiología de los seres humanos, pero excluye una evaluación de la eficacia de la molécula, sus propiedades farmacocinéticas, así como evaluación de toxicidad a largo plazo. Esto restringe gravemente la utilidad de tales modelos animales. Para paliar tales dificultades, se pueden usar primates no humanos, pero el coste referido a tales experimentos restringe mucho el número de animales ensayados, y de esta manera la potencia de la evaluación estadística. Además, aunque hay una alta homología entre genomas de primates humanos y no humanos, las variaciones observadas entre animales individuales contribuyen al valor limitado de estos desenlaces de estudio.

65

Por tanto, hay una necesidad urgente de sistemas mejorados mediante los que se podría probar un compuesto farmacéutico. Óptimamente, el animal se debería hacer tolerante o insensible al compuesto farmacéutico, usando un método que prevenga y/o suprima su capacidad para montar una respuesta inmunitaria a este compuesto sin afectar otras partes de su sistema inmunitario. El animal sería entonces adecuado para evaluar las propiedades farmacocinéticas y la toxicidad de esta molécula.

La solicitud de patente WO2008017517 describe un método en donde epítomos restringidos a clase II se usan o bien para vacunación directa o para la conversión *in vitro* de células T restringidas a clase II, que produce la adquisición por células T CD4+ de fuertes propiedades citolíticas, que inducen apoptosis de la célula presentadora de antígeno (que presenta la proteína que contiene la secuencia del epítomo usado para diseñar el péptido) con la que se ha formado una sinapsis, previniendo de esta manera la activación de células efectoras de inmunidad adaptativa.

La solicitud de patente WO2012069568 describe un método en donde epítomos peptídicos restringidos a CD1d se usan o bien para vacunación directa o para la conversión *in vitro* de células NKT restringidas a CD1d, que produce la adquisición por las células NKT de fuertes propiedades citolíticas, que inducen apoptosis de la célula presentadora de antígeno (que presenta la proteína que contiene la secuencia del epítomo usado para diseñar el péptido) con la que se ha formado una sinapsis CD1d, previniendo de esta manera la activación de células NKT efectoras.

En ambas de estas solicitudes de patente, la invención comprende la inclusión de un motivo oxidorreductasa en los residuos de la secuencia que flanquea la secuencia del epítomo, que es suficiente para obtener la conversión citolítica de las células T restringidas a clase II o las células NKT restringidas a CD1d.

Los animales en necesidad de tratamiento o prevención descritos en la solicitud de patente WO2008017517 o WO2012069568 se hacen insensibles a una proteína terapéutica. De hecho, al apagar la activación de células T restringidas a clase II o NKT restringidas a CD1d, el método previene todas las consecuencias unidas a esta activación. Estas incluyen estimulación de células B para la producción de anticuerpos específicos, activación de células T CD8+ restringidas a clase I citolíticas, activación de células presentadoras de antígeno que lleva a la producción aumentada de citoquinas y expresión aumentada de determinantes de MHC.

Los compuestos farmacéuticos pueden contener epítomos restringidos a clase II, epítomos peptídicos restringidos a CD1d, o ambos tipos de epítomos. Un número significativo de proteínas contiene epítomos restringidos a clase II, pero no epítomos peptídicos restringidos a CD1d. Esto es debido a la naturaleza particular de los péptidos presentados por CD1d, que contienen residuos hidrofóbicos en las posiciones clave.

Sin embargo, CD1d ofrece polimorfismo muy limitado, lo que permite extrapolar conclusiones de un modelo animal a otro de la misma especie animal. Esto no es factible para determinantes de clase II, que pueden necesitar el diseño de péptidos alternativos para inducir insensibilidad cuando se usan varios modelos animales de la misma especie.

Un fragmento de secuencia de una proteína puede contener tanto un epítomo restringido a clase II como un epítomo peptídico restringido a CD1d. En tal caso, y dependiendo de la molécula que se prueba, un único péptido podría producir insensibilidad tanto de células T restringidas a clase II como NKT restringidas a CD1d.

La identificación de epítomos adecuados para la presente invención es conocida en la técnica. Los epítomos restringidos a clase II se obtienen usando una combinación de algoritmos *in silico*, búsqueda en la bibliografía y ensayo *in vitro* o *in vivo*.

Los epítomos peptídicos restringidos a CD1d también se identifican por algoritmos y corresponden a un motivo de secuencia hecho de la secuencia general [FWTHY]-X₂-X₃-[ILMV]-X₅-X₆-[FWTHY] [SEQ ID NO: 11]. Sin embargo, debe estar 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.

El motivo anterior puede ser mas restrictivo mediante lo cual independientemente entre sí la elección del aminoácido en P1 o P7 puede ser [FWTH] o [FWHY] o [FWY] o [FW] y la elección del aminoácido en P4 puede ser [ILM].

La identificación de epítomos restringidos a clase II en proteínas se obtiene como se describe en detalle en el documento WO2008017517. La identificación y selección de un epítomo de célula T en una proteína es como sigue:

(1) se pueden usar uno o más algoritmos *in vitro* para identificar una secuencia de epítomo de células T en esta proteína. Los algoritmos adecuados incluyen, pero no están limitados a los encontrados en las siguientes páginas web:

- <http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>;
- <http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbn/>;
- <http://www.syfpeithi.de/home.htm>;
- <http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC>;
- <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>;

- <http://www.jenner.ac.uk/MHCPred/>

Estos algoritmos se describen en Zhang et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 15, W180-W183 (PREDBALB); Salomon & Flower (2006) *BMC Bioinformatics* 7, 501 (MHCBN); Schuler et al. (2007) *Methods Mol Biol.* 409, 75-93 (SYF-PEITHI); Donnes & Kohlbacher (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, W194-W197 (SVMHC); Kolaskar & Tongaonkar (1990) *FEBS Lett.* 276, 172-174 y Guan et al. (2003) *Appl Bioinformatics* 2, 63-66 (MHCPred).

Más en particular, tales algoritmos permiten la predicción en una proteína antigénica de una o más secuencias de nonapéptidos que ajustarán en el surco de una molécula de MHC II.

- (2) se prueban secuencias peptídicas aisladas de esta proteína mediante, por ejemplo, técnicas de biología de células T, para determinar si las secuencias peptídicas provocan una respuesta de células T. Esas secuencias peptídicas encontradas que provocan una respuesta de células T se definen como que tienen actividad estimuladora de células T medida, por ejemplo, por absorción celular de timidina tritiada.
- (3) los epítomos de células T restringidos a clase II se pueden además opcionalmente ensayar en su afinidad de unión a molécula de MHC de clase II. Esto se puede realizar de diferentes maneras. Por ejemplo, se obtienen moléculas solubles de HLA de clase II por lisis de células homocigotas para una molécula de clase II determinada. La última se purifica por cromatografía de afinidad. Las moléculas de clase II solubles se incuban con un péptido de referencia marcado con biotina producido según su fuerte afinidad de unión para esa molécula de clase II. Los péptidos que se van a ensayar para unión a clase II se incuban después a diferentes concentraciones y su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su unión a clase II se calcula por adición de neutravidina. Los métodos se pueden encontrar, por ejemplo, en Texier et al. (2000) *J. Immunology* 164, 3177-3184.

Como una alternativa, se pueden probar fragmentos de péptidos solapantes en los ensayos anteriores.

La identificación de epítomos peptídicos restringidos a CD1d en proteína terapéuticas se describe en detalle en el documento WO2012069568.

- (1) opcionalmente, evaluación de la capacidad para activar células NKT. Esto se lleva a cabo incubando esta proteína con una línea celular que expresa la molécula CD1d. Los ejemplos de tales líneas celulares se conocen en la técnica (por ejemplo, células JAWS2). La presentación eficaz del péptido o polipéptido por la molécula CD1d se evalúa después midiendo la activación de células NKT, obtenidas de sangre periférica. Estos métodos están descritos en la técnica (por ejemplo, Brutkiewicz (2006) *J. Immunol.* 177, 769-775).
- (2) la proteína se criba para la presencia de al menos un motivo correspondiente a la secuencia [FWHY]-X₂-X₃-[ILMV]-X₅-X₆-[FWHY] [SEQ ID NO: 12] (putativo dominio de unión a CD1d) usando algoritmos bien conocidos en la técnica tal como <http://expasy.org/tools/scanprosite/> [Sigrist et al. (2002) *Brief Bioinform.* 3, 265-274]
- (3) Opcionalmente, un péptido sintético que abarca el motivo de unión a CD1d se ensaya in vitro usando una línea celular que expresa la molécula CD1d como se ha descrito en (1).
- (4) Opcionalmente, el péptido sintético que abarca la secuencia que contiene un motivo de unión a CD1d se ensaya in vitro usando tetrámeros de la molécula CD1d para detectar células NKT específicas para tal péptido.

Un hapteno es una molécula pequeña que no puede por si misma generar una respuesta inmunitaria. Sin embargo, un hapteno se puede volver fuertemente inmunogénico cuando está unido a una proteína soporte. En la mayoría de los casos, el soporte es albúmina, la proteína en circulación más abundante. Sin embargo, un hapteno se puede unir a la superficie celular, generando de esta manera un inmunógeno completo. Un ejemplo de esto está proporcionado por la unión de heparina a la superficie de plaquetas, que puede provocar una respuesta inmunitaria que lleva a la producción de anticuerpos con potente potencial de lisis de plaquetas. La heparina actúa como un hapteno y el factor de plaquetas 4 en la superficie de la plaqueta actúa como un soporte.

La presente definición de hapteno también comprende situaciones específicas en las que el hapteno se une directamente a una molécula de histocompatibilidad principal y de esta manera genera la posibilidad de activar células T directamente. En tales circunstancias, las moléculas de MHC permiten la presentación a células T, que es una propiedad similar a la de un soporte-hapteno. En situaciones adicionales, el hapteno se une directamente a un receptor de células T (TCR) específico, lo que permite que la reactividad del complejo hapteno TCR se active a sí misma en moléculas de MHC. La demostración de estas situaciones también se puede encontrar, por ejemplo, en Weltzien HU, en *Drug hypersensitivity*, ed. W.J Pichler, Karger, 2007; pp47-54, y en Gerber BO y Pichler WJ. *ibid*, pp 66-73. En estas dos situaciones, los péptidos que abarcan epítomos de células T (restringidos a clase II, así como restringidos a CD1d) están hechos de cambios conformacionales de la secuencia MHC.

Huang J et al. (2002) *Nucl. Acids Res.* 40, D271-D277 describen una base de datos (MimoDB) de péptidos que actúan como mimótopos para una variedad de compuestos inmunogénicos.

Los métodos para reproducir epítomos conformacionales a partir de determinantes de MHC se conocen en el estado de la técnica. Los mimótopos se pueden identificar del uso de presentación en fagos. Genotecas de fagos que expresan secuencias de aminoácidos aleatoriamente generadas son obtenibles de suministradores comerciales y se usan para identificar secuencias de aminoácidos que coinciden con la estructura 3D del determinante de MHC modificado por hapteno. Los fagos se seleccionan, por ejemplo, por reactividad hacia un TCR soluble y los fagos seleccionados se expanden en cultivo antes de reapplicar el mismo método de selección.

Para un número de compuestos farmacéuticos, la respuesta inmunitaria en organismos modelo está descrita y se pueden aislar anticuerpos. Tales anticuerpos se pueden usar para identificar péptidos de una biblioteca que actúan como un mimótopo.

5 Los péptidos que abarcan epítomos peptídicos restringidos a clase II o restringidos a CD1d se modifican después por inclusión en residuos flanqueantes de un motivo de 4 aminoácidos [CTS]-x-x-C [SEQ ID NO: 8] o C-x-x-[CTS] [SEQ ID NO: 9], en el que C representa cisteína, S serina, T treonina y x cualquier aminoácido. En formas de realización típicas X no es Trp, Tyr o Phe. Un motivo preferido es C-x-x-C [SEQ ID NO: 10]. Se divulgan detalles sobre el motivo, su localización y configuración en las solicitudes de patente WO2008017517 y WO2012069568. En resumen, el motivo puede estar localizado en cualquiera del extremo amino terminal o carboxi terminal del epítomo. El motivo puede estar directamente adyacente a la secuencia del epítomo o separado del primer (P1) o del último (P9 para epítomos restringidos a clase II y P7 para epítomos peptídicos restringidos a CD1d) por 1, 2, 3 o 4 aminoácidos.

15 Los péptidos que abarcan epítomos peptídicos restringidos a clase II o restringidos a CD1d, o ambos juntos, se pueden administrar al animal de elección por cualquier vía, preferiblemente junto con un adyuvante. En formas de realización preferidas, los péptidos se administran por vía subcutánea después de adsorción en hidróxido de aluminio. Se hacen varias inyecciones hasta que se obtiene una cantidad acumulada mínima de 100 µg en ratones. En animales mayores se consideran concentraciones de hasta 1 mg. Las vías alternativas de administración incluyen vía IV, intranasal o intratraqueal, o intraperitoneal. Se prevén adyuvantes alternativos, en particular para péptidos restringidos a CD1d, para los que puede ser ventajoso usar lípidos o glucolípidos que se sabe que activan células NKT.

20 Una vez se ha llevado a cabo la inmunización con péptidos, en el animal se puede, opcionalmente, ensayar la ausencia de reactividad hacia el compuesto farmacéutico. En un marco preferido, el compuesto se administra por la misma vía que la contemplada para fines terapéuticos.

Los animales se exponen después por vía natural a una dosis fisiológicamente relevante de los compuestos farmacéuticos y se siguen las propiedades del compuesto a lo largo del tiempo.

30 Para la evaluación de la toxicidad, los animales se pueden seguir durante periodos de tiempo prolongados y llevar a cabo la evaluación de toxicidad relevante. Debe ser obvio para los expertos en la materia que el modelo animal de la invención se puede usar para ensayar dosis repetidas durante periodos de tiempo prolongados, lo que es ventajoso, por ejemplo, cuando puede existir un riesgo de acumulación en el cuerpo.

35 Para la evaluación de las propiedades farmacocinéticas de los compuestos farmacéuticos en ensayo, la presente metodología elimina el factor de confusión más importante para tal ensayo, es decir, la respuesta inmunitaria específica. Por tanto, proporciona una oportunidad para llevar a cabo varias evaluaciones de las propiedades farmacocinéticas a lo largo del tiempo, que pueden variar mucho. Se proporciona un ejemplo mediante anticuerpos terapéuticos. La depuración del anticuerpo estará condicionada esencialmente por su reactividad con su diana, en ausencia de respuesta inmunitaria específica. Esto podría producir varias respuestas, en su mayor parte inexploradas del receptor, tal como producción aumentada de la diana misma, alterando de esta manera la dosis terapéutica requerida para controlar el proceso de enfermedad.

45 Los métodos de la presente invención son adecuados para ensayar una amplia gama de medicamentos para varias afecciones, incluyendo, pero no limitados a

- medicamentos para afecciones del sistema cardiovascular tal como hipertensión, arritmia, insuficiencia cardiaca, angina de pecho, diuréticos, hipotensión e hiperlipidemia
- medicamentos para afecciones del aparato digestivo (incluyendo náusea y vómitos) tal como antiácidos, colagogos y coleréticos, laxantes, antidiarreicos, fármacos antiinflamatorios y antisépticos
- medicamentos para afecciones del sistema urogenital tal como hipertrofia de próstata benigna, impotencia
- medicamentos para afecciones del aparato respiratorio tal como asma y EPOC, tos, analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, gota
- medicación que actúa a nivel del SNC tal como hipnóticos, antipsicóticos, antidepresivos, Parkinson, epilepsia, migraña, antihistamínicos, inhibidores de colinesterasa hormonas en general
- antibióticos
- compuestos antivirales
- compuestos antifúngicos
- compuestos antiparásitos
- compuestos antitumorales.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, que no debe considerarse como limitada por tales ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Diseño de una secuencia de mimótopo para un compuesto farmacéutico no proteico

Las sustancias químicas pequeñas se pueden unir directamente a proteínas tales como albúmina o proteínas de membrana. Esta unión puede producir una reacción inmunitaria cuando tal sustancia química pequeña se une a una secuencia de la proteína que es parte de un epítipo reconocido por células T. Para mimetizar este tipo de interacción, epítipos funcionales de células T, como, por ejemplo, los presentados en el contexto de complejos de MHC de clase II, se pueden producir por interacción de la sustancia química con la secuencia peptídica, produciendo de esta manera un mimótopo. En tal marco, la sustancia química se une a un residuo de aminoácido que entra en contacto con el TCR, conservando mediante ello la capacidad del epítipo de unirse a residuos de anclaje para unión a moléculas de clase II. Un ejemplo es la producción de anticuerpos hacia penicilina, que está dirigida por activación de células T restringidas a clase II, cuyo receptor es específico para el epítipo modificado por reacción con el anillo betalactama de penicilina. Otro ejemplo es la activación de células T CD4+ con epítipos modificados con iones metálicos, tal como berilio o níquel.

El anillo beta-lactama de penicilina es la diana para un ataque nucleófilo por grupos amino libres de proteínas y en particular grupos épsilon amino de lisina, lo que produce unión amida covalente. Los epítipos de células T restringidos a clase II o epítipos peptídicos de NKT restringidos a CD1d que contienen lisina pueden formar complejos covalentes con penicilina. Tales epítipos están presentados y se activan o bien por células T CD4+ restringidas a clase II o células NKT restringidas a CD1d, respectivamente.

Se sabe que un epítipo de la proteína cofactor de membrana (MCP) se presenta en el contexto de un determinante de MHC de clase II, DRB1* 1101. La secuencia de este epítipo, que corresponde a los residuos 315-328 de MCP, contiene varias lisinas (PYRYLQRRKKKGK [SEQ ID NO: 1]). La incubación de este epítipo con penicilina G produce la sustitución de la lisina en posición 8 del epítipo (subrayada). Este mimótopo es capaz de activar células T CD4+ derivadas de células T CD4+ de sangre periférica de pacientes con respuesta inmunitaria a penicilina (Padovan et al. (1997) Eur. J. Immunol. 27, 1303-1307).

Para el fin de los métodos de la presente invención, la secuencia de mimótopo se modificó después por adición de un motivo de 4 aminoácidos que contiene una actividad oxidorreductasa, de modo que se generara la secuencia CPYCVPYRYLQRRKKKGK [SEQ ID NO: 2], que incluye un motivo oxidorreductasa en el extremo amino, 2 aminoácidos como un enlazador (VP), y la secuencia del mimótopo.

La administración de un péptido sintético que abarca el péptido de SEQ ID NO: 2 a un ratón convertido en transgénico para la expresión de la molécula de clase II humana DRB1*1101 suprime la capacidad del ratón de provocar una respuesta inmunitaria hacia penicilina.

Ejemplo 2. Evaluación farmacocinética de moléculas de factor VIII en animales modelo

La terapia de sustitución del factor VIII se usa para el tratamiento de pacientes de hemofilia A. Sin embargo, el t ½ de FVIII en circulación es solo 90 minutos. En presencia del factor de Von Willebrand, su molécula chaperona fisiológica, el t ½ de FVIII aumenta hasta 6 h. La producción de moléculas de FVIII con t ½ prolongado es un fin largamente esperado. Se han propuesto recientemente un número de moléculas de FVIII con t ½ aumentado. Estas se obtienen o bien por fusión con la parte Fc gamma de anticuerpos IgG para asegurar la recirculación de FVIII mediante el FcRN, sustitución con moléculas de PEG, o entrecruzamiento de dominios de FVIII para reducir su catabolismo. La evaluación del t ½ para tales construcciones de FVIII modificada se lleva a cabo en modelos animales. Aquí, se inyectan ratones sanos con dosis crecientes de FVIII humano y la persistencia del FVIII administrado se evalúa a lo largo del tiempo. Sin embargo, FVIII humano es muy inmunógeno en ratones y provoca rápidamente una respuesta inmunitaria. Esto también se produce en ratones suficientes en (y por tanto tolerantes a) su propio FVIII, ya que las diferencias de secuencias entre FVIII de ratón y humano son suficientes para provocar una respuesta inmunitaria en ratón. El resultado final es que incluso después de un número muy limitado de inyecciones, la aparición de anticuerpos murinos hacia el FVIII humano administrado excluye cualquier ensayo adicional de propiedades farmacocinéticas, ya que los anticuerpos murinos neutralizan inmediatamente el FVIII humano administrado.

Un péptido sintético que abarca el epítipo de células T restringido a clase II de factor VIII humano y un motivo CxxC CGHC GG FTNMFATWSPSK [SEQ ID NO: 3] se usa para inmunizar ratones sanos antes de la administración de FVIII humano. Se hacen cuatro inyecciones de 50 µg de tal péptido adsorbido sobre hidróxido de aluminio por vía subcutánea a ratones sanos y a intervalos semanales. Se muestra que los ratones son tolerantes a FVIII humano y se usan para evaluación cinética de la molécula de FVIII con t ½ prolongado.

Ejemplo 3. Prevención de una respuesta inmunitaria al factor VIII humano en perros no endogámicos

En animales tales como perros, se generan anticuerpos igualmente contra FVIII humano. Aunque estos anticuerpos no neutralizan FVIII humano, estos anticuerpos tienen un efecto sobre la eliminación biológica de FVIII humano administrado a tales modelos animales.

Los ratones y otros roedores son con frecuencia cepas endogámicas que tienen todos el mismo tipo de moléculas de MHC de clase II. Otros animales tal como perros son exogámicos y pueden portar determinantes de MHC de clase II

variables entre animales. Para organizar un experimento fiable, se debe realizar un mapeo de HLA de clase II en cada animal para asegurar que el péptido administrado es reconocido de forma eficaz.

5 Sin embargo, la ausencia de polimorfismo de la molécula CD1d hace posible usar un único péptido con un epítipo peptídico de NKT y una secuencia de motivo redox para apagar la respuesta inmunitaria hacia el antígeno en todos los animales de la especie, también en cepas exogámicas.

10 Los perros se inmunizan con 250 µg de un epítipo restringido a CD1d de factor VIII humano mediante administración subcutánea de un péptido sintético adsorbido sobre alumbre, cuya secuencia es CPYC-VP-QTLHKFILLFA [SEQ ID NO:4].

15 Este péptido contiene la secuencia de aminoácidos del factor VIII humano amino 190-200 (QTLHKFILLFA [SEQ ID NO:5]), con residuos de anclaje a CD1d en las posiciones 1, 4 y 7 (subrayadas), un enlazador de 2 aminoácidos (VP) y un motivo de tiorreductasa en el lado amino terminal.

Se lleva a cabo un total de 4 inyecciones con péptido adsorbido sobre hidróxido de aluminio en un intervalo de 10 días.

20 Los perros se tratan después por administración intravenosa de factor VIII humano de longitud completa y las propiedades farmacocinéticas del factor VIII humano se evalúan después tras la inyección repetida de factor VIII humano.

Ejemplo 4. Evaluación de la toxicidad de anticuerpos anti-TNF alfa

25 La administración de anticuerpos monoclonales humanizados en pacientes que padecen enfermedades inflamatorias crónicas tal como artritis reumatoide es hoy en día una práctica común. Aunque en general se observa mejora clínica, la administración a largo plazo de tales anticuerpos terapéuticos produce efectos secundarios y complicaciones graves. Estos ejemplos se han identificado esencialmente en pacientes tratados a plazos más largos con el anticuerpo terapéutico, y no se predijeron de la evaluación de toxicología preclínica en animales. La principal razón para esto está relacionada con la alta inmunogenicidad de tales anticuerpos terapéuticos en modelos animales, ratones o ratas en particular.

35 Un epítipo de células T restringido a H-2b para ratón C57BL/6 se encuentra en la cadena pesada del anticuerpo anti-TNF-alfa Humira™: YYAPWCNN [SEQ ID NO: 6]

Se administra un péptido que comprende este epítipo y una secuencia con motivo redox (CPYC VP YYAPWCNN [SEQ ID NO:7]) a ratones C57BL/6 de tipo salvaje no reumatoides a una dosis de 50 µg por inyección hecha por la vía subcutánea, 4 veces en un intervalo de una semana.

40 Los ratones se trataron después por administración intravenosa del anticuerpo anti-TNF-alfa. En ausencia de respuesta inmunitaria hacia el anticuerpo, las inyecciones se pueden repetir y los efectos de tal administración se pueden evaluar a largo plazo.

Ejemplo 5. Evaluación de la toxicidad de la administración repetida de un derivado pegilado de factor VIII

45 Los compuestos farmacéuticos con frecuencia tienen un $t_{1/2}$ reducido y se han propuesto varios intentos de prolongar su actividad. Así, la sustitución con residuos de etilenglicol se usa actualmente para un número de tales compuestos farmacéuticos. Aunque esto se considera un procedimiento seguro, algunos informes identifican la acumulación de moléculas pegiladas en fagocitos tal como macrófagos. En efecto, la sustitución con PEG aumenta el $t_{1/2}$ al enmascarar residuos implicados en la depuración de compuestos farmacéuticos de la circulación. También previene la digestión por el proteasoma y como tal puede aumentar la acumulación celular. La marca distintiva de tal acumulación es habitualmente la aparición de macrófagos espumosos.

55 Las proteínas pegiladas son esencialmente eliminadas por el riñón y por el hígado. Artículos han mostrado la acumulación de vacuolas en células epiteliales tubulares renales, así como en células de Kupffer de hígado. Estas preocupaciones sobre la seguridad de compuestos farmacéuticos sustituidos con PEG requiere evaluación a largo plazo en modelos animales adecuados (Zhang et al. (2014) Biol. Pharm. Bull. 37, 335-339).

60 Esta evaluación está gravemente limitada por el hecho de que las proteínas PEGiladas pueden ser inmunógenas. Primero, se ha descrito que PEG mismo provoca una respuesta inmunitaria de IgM, que puede desencadenar la activación de la ruta del complemento, opsonización y eliminación por células de Kupffer. Además, la inmunogenicidad del compuesto farmacéutico mismo, aunque reducida por la pegilación, no se elimina. Por estas 2 razones, es ventajoso evaluar estos fenómenos.

65 La producción de anticuerpos IgM hacia fracciones PEG es independiente de células T y, por tanto, no se puede eliminar mediante la presente invención. Por el contrario, prevenir cualquier respuesta inmunitaria hacia el compuesto

farmacéutico mismo, ya previene parte de la respuesta inmunitaria contra el compuesto farmacéutico y representa una mejora significativa y permite ensayar la toxicidad de PEG durante periodos de tiempo largos. La respuesta de IgM hacia PEG no induce memoria y no es problemática para los estudios de toxicidad a largo plazo.

5 Se inmunizan ratones sanos según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 y después se tratan mediante administración regular de FVIII humano pegilado durante periodos de tiempo largos. En puntos de tiempo distintos, los ratones se sacrifican y se examina el nivel de vacuolización del epitelio de células tubulares del riñón y el de las células de Kupffer del hígado.

10 **Lista de secuencias**

<110> ImCyse SA Saint-Remy, Jean-Marie Vander Elst, Luc Carlier, Vincent

<120> Modelos animales novedosos para evaluar compuestos farmacéuticos

15 <130> IMC2990EP

<150> EP15167964.4

<151> 18-05-2015

20 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> fragmento de la proteína cofactor de membrana (MCP)

<400> 1

Pro Tyr Arg Tyr Leu Gln Arg Arg Lys Lys Lys Gly Lys
1 5 10

35 <210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> motivo redox + fragmento de MCP

<400> 2

Cys Pro Tyr Cys Val Pro Tyr Arg Tyr Leu Gln Arg Arg Lys Lys Lys
1 5 10 15

45 Gly Lys

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo redox + fragmento del factor VIII humano

55 <400> 3

Cys Gly His Cys Gly Gly Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro
1 5 10 15

Ser Lys

ES 2 702 386 T3

- <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> motivo redox + fragmento del factor VIII humano
- 10 <400> 4

Cys	Pro	Tyr	Cys	Val	Pro	Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe
1				5					10					15	
- Ala**
- 15 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> fragmento del factor VIII humano
- <400> 5

Cys	Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala
1				5					10		
- 25 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> fragmento de anticuerpo anti-TNF alfa
- <400> 6

Tyr	Tyr	Ala	Pro	Trp	Cys	Asn	Asn
1				5			
- 35 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> motivo redox + fragmento de anticuerpo anti-TNF alfa
- <400> 7

Cys	Pro	Tyr	Cys	Val	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Pro	Trp	Cys	Asn	Asn
1				5					10				
- 45 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> motivo redox
- 55 <220>
 <221> variante
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es Cys, Ser o Thr

<220>
 <221> variante
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 5

<220>
 <221> variante
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 10

<400> 8
Xaa Xaa Xaa Cys
1

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <223> motivo redox
 20

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 25

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 30

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Cys, Ser o Thr
 35

<400> 9
Cys Xaa Xaa Xaa
1

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40

<220>
 <223> motivo redox
 45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 55

<400> 10
Cys Xaa Xaa Cys
1

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60

- <220>
<223> motivo NKT
- 5 <220>
<221> variante
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es Phe, Trp, Thr, His o Tyr
- 10 <220>
<221> variante
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 15 <220>
<221> variante
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 20 <220>
<221> variante
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Val, Ile, Leu o Met
- 25 <220>
<221> variante
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 30 <220>
<221> variante
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 35 <220>
<221> variante
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es Phe, Trp, Thr, His o Tyr
- 40 <400> 11
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
- <210> 12
<211> 7
- 45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> motivo NKT
- 50 <220>
<221> variante
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es Phe, Trp, His o Tyr
- 55 <220>
<221> variante
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 60 <220>
<221> variante
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 65

<220>
<221> variante
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Val, Ile, Leu o Met

5

<220>
<221> variante
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

10

<220>
<221> variante
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15

<220>
<221> variante
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es Phe, Trp, His o Tyr

20

<400> 12

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar un parámetro de un compuesto farmacéutico contra una enfermedad o trastorno, que comprende las etapas de:
- 10 - proporcionar un animal no humano que no padece o no muestra síntomas o signos de dicha enfermedad o trastorno y que no provoca una respuesta inmunitaria contra dicho compuesto farmacéutico, por lo cual el animal es obtenible por administración de un péptido que comprende un motivo oxidoreductasa con la secuencia [CTS]-x-x-C [SEQ ID NO: 8] o [C]-x-x-[CTS] [SEQ ID NO: 9] y que comprende además un epítipo peptídico de NKT o un epítipo de células T de MHC de clase II de dicho compuesto farmacéutico, en donde dicho motivo y dicho epítipo están separados por un enlazador de entre 0 y 4 aminoácidos,
- 15 - administrar dicho compuesto farmacéutico al animal no humano,
- medir un parámetro de dicho compuesto farmacéutico en el animal no humano.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el compuesto farmacéutico es una proteína y la secuencia del epítipo es un fragmento de dicha proteína.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto farmacéutico es una proteína con un epítipo dependiente de conformación y la secuencia del epítipo es un mimótopo de dicho epítipo dependiente de conformación.
- 20 4. El método según la reivindicación 1, en donde el compuesto farmacéutico no es proteico y la secuencia del epítipo es la secuencia de un mimótopo para dicho compuesto farmacéutico.
- 25 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el motivo es C-x-x-C.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el epítipo peptídico de NKT tiene el motivo [FWTHY]-X₂-X₃-[ILMV]-X₅-X₆-[FWTHY] [SEQ ID NO: 11].
- 30 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el animal no es un primate.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el animal es un roedor.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el animal es animal exogámico.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el parámetro se selecciona de uno o más del grupo que consiste en toxicidad, tiempo de semivida, el efecto sobre: peso corporal, movilidad, hábitos de alimentación, respiración, micción y deposición de heces, aspecto del pelaje.
- 40 11. Uso de un animal no humano, que es no respondedor a una respuesta inmunitaria contra un compuesto farmacéutico contra una enfermedad o trastorno, obtenible por un método que comprende las etapas de:
- 45 - proporcionar un animal no humano que no padece o no muestra síntomas o signos de dicha enfermedad o trastorno, y que no ha recibido dicho compuesto farmacéutico,
- administrar un péptido que comprende:
- un motivo oxidoreductasa con la secuencia [CTS]-x-x-C [SEQ ID NO: 8] o [C]-x-x-[CTS] [SEQ ID NO: 9], y
- un epítipo peptídico de NKT o un epítipo de células T de MHC de clase II de dicho compuesto farmacéutico, en donde el motivo y el epítipo están separados por un enlazador de entre 0 y 4 aminoácidos,
- 50 en ensayar la toxicidad de un fármaco, o en determinar un parámetro farmacocinético de un fármaco.