

preservation of several tropical plant species using encapsulation/dehydration of apices. Proceedings of the 7th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture; 1994 Junio; Florencia, Italia.

González-Arno MT, Urrea C, Engelmann F, Ortiz R, de la Fe C, Lukse E, *et al.* Evaluación de la técnica de criopreservación para preservar a largo plazo los recursos genéticos de la caña de azúcar. En: Estrada MP, Riego E, Limonta J, Téllez P, de la Fuente J, editores. Avances en Biotecnología Moderna. Vol 3; 1995 Nov 13-18; La Habana, Cuba. La Habana: Elfos Scientiae; 1995. p.II.11.

Torres MA, González-Arno MT, Urrea C, Moreira T, Engelmann F. Criopreservación de germoplasma de plátano (*Musa spp.*). En: Estrada MP, Riego E, Limonta

J, Téllez P, de la Fuente J, editores. Avances en Biotecnología Moderna. Vol 3; 1995 Nov 13-18; La Habana, Cuba. La Habana: Elfos Scientiae; 1995. p.II.22.

Martínez ME, González-Arno MT, Nieves N, Blanco MA, González J, Borroto C, *et al.* Plant regeneration from cryopreserved calli of sugarcane (*Saccharum sp.*) variedad CP 5243 by a simplified method. En: Estrada MP, Riego E, Limonta J, Téllez P, de la Fuente J, editores. Avances en Biotecnología Moderna. Vol 3; 1995 Nov 13-18; La Habana, Cuba. La Habana: Elfos Scientiae; 1995. p.II.12.

González-Arno MT. Desarrollo de una técnica para la criopreservación de meristemas apicales de caña de azúcar. Tesis de Doctorado en Ciencias Técnicas. La Habana: ISPJAE; 1996.

9. González Arno MT, Engelmann F, Urrea C, M Morenza, Rios A. Cryopreservation of Citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. Cryo-Letters 1998;19:177-82.

10. Durán-Vila N, González Arno MT, Engelmann F. Cryopreservation and *in vitro* culture. Technical Bulletin Newsletter: Conservation of plant germplasm. IPGRI; 1997.

11. González-Arno MT, Márquez M, Urrea C, Martínez M, Engelmann F. Cryopreservation of pineapple apices by vitrification. Cryo-Letters; 1999 (de próxima aparición).

Humanización de epitopos T en las regiones variables murinas de un anticuerpo que reconoce al receptor del factor de crecimiento epidérmico: obtención de inmunoglobulinas de menor inmunogenicidad

✉ Cristina M Mateo de Acosta del Río, Josefa Lombardero Valladares, Ernesto Moreno, Rolando Pérez Rodríguez

Centro de Inmunología Molecular. Calle 206 No. 1926, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana. Fax: (53-7) 33 5049; E-mail: cristina@ict.cim.sld.cu

Introducción

Existen numerosas evidencias experimentales que apuntan a la relación existente entre el sistema EGF/EGF-R (factor de crecimiento epidérmico/receptor del factor de crecimiento epidérmico) y el cáncer, por lo que no es sorprendente que este sistema se haya convertido en un blanco atractivo para el diseño de nuevos medicamentos antitumorales. Diferentes grupos de trabajo, incluido el del colectivo de autores, han obtenido anticuerpos monoclonales bloqueadores de la señalización del receptor. Estos anticuerpos inhiben el crecimiento de tumores humanos en ratones atómicos. Sin embargo, los anticuerpos murinos han resultado demasiado inmunogénicos en humanos, lo que dificulta sus aplicaciones terapéuticas.

Materiales y Métodos

Se rediseñó el Anticuerpo Monoclonal R3 (AcM R3) como una inmunoglobulina humana IgG1, mediante la transplatación de los CDR (regiones determinantes de la complementariedad) del anticuerpo murino, en los marcos (FR) de las regiones variables humanas de las cadenas pesadas y ligeras Eu y Rei, respectivamente.

Mediante la utilización de este sistema como modelo, se evaluó un nuevo método de humanización mucho más simple que el método tradicional, basado en el carácter de antígeno T-dependiente de las inmunoglobulinas y en la alta homología existente entre las inmunoglobulinas murinas y humanas. El método consiste en sustituir aquellos residuos murinos incluidos en los posibles epitopos T de los marcos de las regiones variables, por los que se encuentran en la misma posición de las inmunoglobulinas humanas de mayor homología, excepto aquellos residuos críticos en la conformación de los CDR. Los posibles epitopos T en las regiones V_H (región variable de cadena pesada) y

V_K (región variable de cadena ligera) del R3, fueron predichos por el programa AMPHI.

Resultados y Discusión

Se obtuvo un anticuerpo monoclonal reformado h-R3 neutralizante del EGF-R, con una K_i de 10⁻⁸ M, el cual ha sido objeto de seis solicitudes de patente.

Para obtener este anticuerpo fue necesario clonar y secuenciar la región variable del AcM R3 murino, clonar las cadenas ligera y pesada murinas del mismo en vectores de expresión de células superiores, que tienen incluidas las regiones constantes humanas C_K (para la cadena ligera) y gamma 1 en el vector de expresión de la cadena pesada, con lo que se obtuvieron las construcciones genéticas quiméricas de las cadenas pesada y ligera del R3, es decir, las regiones variables murinas y regiones constantes humanas. Estas construcciones genéticas se introdujeron por transfección en células de mieloma NSO (mieloma no productor de inmunoglobulinas) y se expresó el anticuerpo quimérico R3, que fue capaz de reconocer el EGF-R.

El anticuerpo humanizado se obtuvo mediante trasplante de los CDR del anticuerpo murino, en los marcos de las regiones variables humanas de las cadenas pesada y ligera Eu y Rei, respectivamente. Este anticuerpo perdió la capacidad de unión al EGF-R. A partir del mismo, se construyó un anticuerpo reformado al que se le reintrodujeron residuos murinos en algunas posiciones de los marcos humanos. Para la construcción de este anticuerpo reformado, se hizo un análisis de los residuos de las regiones marcos que pudieran influir en la conformación que adoptan los CDR para el adecuado reconocimiento del antígeno y para tratar de mantener los mis-

✉ Autor de correspondencia

Tabla. Región variable de la cadena pesada de los anticuerpos reformados de R3.

	10															
A	cag	gtc	caa	ctg	cag	cag	agc	ggt	gca	gag	gtg	aag	aaa	cct	ggc	agc
B	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20						30									
A	agc	gtg	aaa	gtg	agc	tgc	aag	gcg	tct	ggc	tac	acc	ttc	acc	aat	tat
B	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40															
A	tat	atc	tat	tgg	gtg	aga	cag	gca	cct	gga	caa	ggt	ctt	gag	tgg	atc
B	Y	I	Y	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50				52A				60							
A	gga	ggg	ata	aac	ccc	acc	tct	gga	ggg	agt	aac	ttt	aat	gaa	aag	ttc
B	G	G	I	N	P	T	S	G	G	S	N	F	N	E	K	F
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	66			67			70				75		76			
A	aag	aca	aGa	gTg	aca	att	acg	gta	gac	gag	agc	aCG	aAc	acg	gcg	tac
B	K	T	R	V	T	I	T	V	D	E	S	T	N	T	A	Y
C	-	-	K	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	T	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	82A				83				90							
A	atg	gaa	ctc	agc	agc	ctg	aga	tcc	gag	gac	acc	gcg	ttc	tat	ttt	tgt
B	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	F	Y	F	C
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	93															
A	Gca	aga	cag	ggc	ttg	ttg	ttc	gac	agt	gac	gga	cgg	ggc	ttt	gac	ttc
B	A	R	Q	G	L	W	F	D	S	D	G	R	G	F	D	F
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100A											101				
A	fgg	ggt	caa	ggc	agc	acc	gtc	acc	gtc	agc	agc					
B	W	G	Q	G	S	T	V	T	V	S	S					
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

A: secuencia de ADN de la región V_H del anticuerpo humanizado.

B: secuencia de aminoácidos de la región V_H del anticuerpo humanizado.

C, D, E: secuencias de aminoácidos de las diferentes versiones de las regiones V_H reformadas.

En negritas se destacan los CDR y en mayúsculas las bases mutadas.

mos, para no afectar la zona de unión del anticuerpo a su antígeno. En el marco de estos estudios, se construyeron variantes de anticuerpos híbridos quiméricos y humanizados. Cuando las células NSO se cotransfectaron con un híbrido construido con la cadena ligera humanizada y la cadena pesada quimérica, el anticuerpo obtenido se comportó igual que el R3 murino. La combinación inversa, es decir, el híbrido construido entre la cadena ligera quimérica y la cadena pesada humanizada, se comportó igual que el R3 humanizado.

Estos resultados indicaron que los cambios introducidos por la humanización de la cadena ligera no afectaron el reconocimiento del anticuerpo por su receptor, por lo que el trabajo genético de reintroducir algunos residuos murinos en los marcos humanos para recuperar la actividad biológica del anticuerpo, se concentró en la cadena pesada.

Para recuperar la capacidad de inhibición de la unión del EGF a su receptor por el R3 humanizado, se hizo necesario introducir en los marcos humanos algunos

residuos de aminoácidos que se encontraban en la misma posición en la inmunoglobulina murina original. A esta nueva construcción genética se le llamó "anticuerpo reformado". Como se explicó anteriormente, estos cambios se concentraron en la cadena pesada humanizada, manteniéndose intacta la cadena V_K humanizada.

Estas mutaciones se realizaron en tres grupos diferentes: mutaciones en las posiciones 66-67, 75-76 y, por último, 93, considerando su localización en diferentes regiones y la influencia que pudieran tener en el sitio de combinación del antígeno. Se construyeron seis versiones del anticuerpo reformado R3, en las que uno, dos o tres de los grupos de residuos se mutaron para introducir en dichas posiciones los aminoácidos que aparecen en la secuencia del R3 murino en la misma posición (Tabla).

Los residuos murinos de los marcos de V_H , LYS66 y ALA67 fueron reintroducidos porque se encuentran en la frontera entre CDR2 y FR3, y las mismas mostraron

ser necesarias en la recuperación de la afinidad por el EGF-R en el anticuerpo 425, que presenta una alta homología con la región variable de la cadena pesada del R3. Estos cambios no resultaron importantes, puesto que el anticuerpo reformado recuperó muy poco la capacidad de inhibir la unión del EGF a su receptor.

Se construyeron, además, anticuerpos reformados con SER75, THR76 y THR93 de origen murino. Las versiones de R3 reformado, R3-S75T76 y R3-T93, mostraron cambios importantes en la capacidad de inhibición de la unión del EGF-I¹²⁵ a su receptor, con valores de K_i entre $1,34$ y $1,59 \times 10^{-8}$ M, mientras que las versiones R3-S75T76T93 o R3-K66A67S7 5T76T93, que incluyen los residuos SER75, THR76 y THR93, recuperaron la inhibición de la unión del EGF-I¹²⁵ a EGF-R, con una K_i de aproximadamente 1×10^{-8} M. Este valor es muy cercano al que tiene el anticuerpo murino R3 ($0,7-0,8 \times 10^{-8}$ M). Esta versión de anticuerpo reformado fue la escogida para hacer los experimentos *in vivo*.

Solo tres mutaciones en los marcos humanos por los correspondientes residuos de ratón, permitieron recuperar 80% de la afinidad por el antígeno. Este anticuerpo reformado resultó mucho menos inmunogénico en monos que los anticuerpos quimérico y murino correspondientes.

Se describió por primera vez en la literatura la importancia del residuo 76 de la región variable de la cadena pesada en la conformación del sitio de unión del anticuerpo. Sólo existe otro anticuerpo recombinante neutralizante del EGF-R, el cual se encuentra en ensayos clínicos en estos momentos. El c225 es un anticuerpo quimérico con afinidad similar a h-R3 que en la actualidad se encuentra en desarrollo por Imclone Systems Inc., NY, y debe recibir aprobación en el año en curso por parte de la FDA para iniciar la fase III de ensayos clínicos en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. El anticuerpo reformado h-R3, que en principio debe resultar menos inmunogénico que c225 por estar reformado, recibió la aprobación del Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED) para iniciar la fase I de ensayos clínicos en pacientes con tumores de origen epitelial en Cuba, y del HPB para iniciar ensayos clínicos en Canadá. Estos ensayos en Canadá comenzaron en noviembre de 1998. De lo anterior se deriva la novedad científica y tecnológica de este resultado.

Se desarrolló un nuevo método de reducción de la inmunogenicidad de anticuerpos recombinantes mucho más simple desde el punto de vista de la manipulación genética y que consume mucho menos tiempo de trabajo, comparado con el método clásico de humanización reportado en la literatura. Este método se sustenta en la naturaleza de antígenos T-dependientes de las inmunoglobulinas, y en la gran homología

existente entre las regiones variables de las inmunoglobulinas humanas y murinas. El carácter innovativo del método consiste en que sólo la humanización de las regiones anfipáticas (posibles epitopos T), que constituyen entre 10 y 27% de las regiones variables, permite una reducción considerable de la inmunogenicidad, lo que se logra con unas pocas mutaciones puntuales. Es decir, con este método, una vez construido el anticuerpo quimérico, sólo hay que introducir algunas mutaciones puntuales que sustituyan residuos de aminoácidos humanos en las regiones marcos murinas, de forma tal que el quimérico modificado reconozca al antígeno con afinidad similar a la del anticuerpo quimérico y sea menos inmunogénico que éste, sin necesidad de hacer un anticuerpo humanizado.

Reconocimientos

Los autores dejan constancia de su reconocimiento a Alejo Morales Morales, Gumersinda Bombino, Irene Bousulei, Mayra Ramos y Normando Iznaga por su importante colaboración.

Bibliografía

Mateo C, Lombardero J, Armour K, Moreno E, Pérez R. Reshaping of a human monoclonal antibody to epidermal growth factor receptor to recover binding affinity. *Biotecnología Aplicada* 1997;14:49.

Mateo C, Lombardero J, Moreno E, Bombino G, Pérez R. A different method for obtaining an engineered murine antibody, that recognizes epidermal growth factor receptor, with reduced immunogenicity. *Biotecnología Aplicada* 1997;14:58.

Mateo C, Moreno E, Armour K, Lombardero J, Harris W, Pérez R. -Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the Epidermal Growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology* 1997;3:71-81.

Mateo C, Lombardero J, Moreno E, Morales A, Bombino G, Wims L, Coloma J, Pérez R, Morrison S. Removal of T cell epitopes from genetically engineered antibodies: Production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Nature Biotechnology* (enviada en septiembre/98).

Humanized and chimeric monoclonal antibodies that recognized Epidermal growth Factor Receptor. Use Diagnostic and therapeutic. Patente presentada a Europa, No. 9520 3126.8 y concedida en USA, No. 08/560.558

Method for obtaining modified immunoglobulins with reduced immunogenicity of murine antibody variable domains and compositions containing them. Patente concedida en USA en 1997, No. 5,712,120, y presentada en Europa, No. 95 201752.3