



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 635**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94901552 .3**

86 Fecha de presentación : **16.11.1993**

87 Número de publicación de la solicitud: **0676965**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.1995**

54

Título: **Método para reducir la inmunogenicidad de la región variable de anticuerpos.**

30

Prioridad: **16.11.1992 US 977705**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73

Titular/es: **CENTOCOR Inc.**
200 Great Valley Parkway
Malvern, Pennsylvania 19355-1307, US

72

Inventor/es: **Jordan, Robert E.;**
Wagner, Carrie Lynne y
Knight, David M.

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 293 635 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para reducir la inmunogenicidad de la región variable de anticuerpos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para reducir la inmunogenicidad de una región variable de anticuerpo inmunogénico mediante la incorporación de una secuencia autoantigénica, que forma un epítipo reconocido por anticuerpos preinmunitarios humanos cuya presencia da como resultado una respuesta inmunitaria reducida contra la región variable de un anticuerpo.

Antecedentes de la invención

El uso farmacéutico de compuestos inmunogénicos, tales como proteínas y carbohidratos, para diagnóstico o terapia en seres humanos tiene un enorme potencial. Sin embargo, un problema principal es que los compuestos inmunogénicos a menudo provocan respuestas inmunitarias que podrían limitar su eficacia y, en algunos casos, provocar reacciones alérgicas peligrosas. Esto es particularmente cierto para proteínas no humanas. Además, es posible que incluso proteínas con secuencias de aminoácidos humanas puedan ser inmunogénicas, como en los casos en los que la proteína está alterada en la estructura o conformación como consecuencia de la fabricación o cuando la proteína se produce en huéspedes extraños debido a modificación postraduccional inapropiada o plegamiento impropio. Por otra parte, muchos compuestos no proteínicos provocan una respuesta inmunitaria.

El sistema inmunitario del ser humano al que se administra el compuesto inmunogénico reconoce el compuesto como "extraño" y monta una respuesta inmunitaria para retirarlo. La respuesta inmunitaria incluye la producción de anticuerpos específicos de alta afinidad que se unen a y efectúan la eliminación del compuesto inmunogénico.

Los anticuerpos monoclonales (Mabs) proporcionan ejemplos de los usos terapéuticos de proteínas extrañas. La mayoría de los Mabs son de origen murino y generalmente se ha encontrado que son inmunogénicos cuando se inyectan en seres humanos. Se han hecho intentos de reducir la inmunogenicidad de Mabs murinos substituyendo por regiones constantes humanas las regiones murinas análogas para formar anticuerpos quiméricos o Mabs quiméricos, o yendo un paso más allá y substituyendo por secuencias de entramado humanas los homólogos murinos en las regiones variables de los anticuerpos (anticuerpos humanizados o Mabs humanizados). Estos sistemas pueden reducir la respuesta inmunitaria provocada por regiones constantes o entramados murinos, pero pueden ser ineficaces para reducir respuestas inmunitarias dirigidas contra las regiones variables o los idiotipos de los Mabs. En efecto, existen varios ejemplos de Mabs quiméricos que provocan respuestas inmunitarias dirigidas contra las regiones variables (por ejemplo, B72.3 presentado por Meredith y otros, (1992) J. Nucl. Medicine 33:23-29, y ch14.18 presentado por Saleh y otros, (1992) Hum. Antibody Hybridoma 3:19-24). De hecho, las respuestas inmunitarias a la anti-región variable pueden ser la norma en vez de la excepción. En estos casos, se requiere otro sistema.

Existe una necesidad de compuestos terapéuticos o diagnósticos que o bien no provoquen una respuesta inmunitaria o bien que provoquen una respuesta inmunitaria reducida. Existe una necesidad de un método para reducir o eliminar la inmunogenicidad de compuestos terapéuticos y diagnósticos.

La presente invención proporciona un método para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos en el que el sistema monta una respuesta inmunitaria reducida contra el compuesto o no monta ninguna respuesta inmunogénica en absoluto contra él. De acuerdo con esto, estos compuestos pueden administrarse como substancias terapéuticas o diagnósticas con una reducción o eliminación de los problemas asociados con la administración de compuestos inmunogénicos.

50 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de fusión con inmunogenicidad reducida que comprenden compuestos inmunogénicos conectados a secuencias autoantigénicas. La presencia de la secuencia autoantigénica hace al compuesto menos inmunogénico. Además, la presente invención se refiere a un método para reducir la inmunogenicidad de un compuesto inmunogénico conectando una secuencia autoantigénica a un compuesto de otro modo inmunogénico. La presente invención también se refiere a una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica secuencias autoantigénicas y a péptidos autoantigénicos esencialmente puros.

Descripción detallada de la invención

Se ha observado la presencia de anticuerpos en suero humano normal que son específicos para porciones de proteínas degradadas, tales como porciones de proteínas endógenas degradadas por enzimas proteolíticas. Existen muchos informes en la bibliografía que se refieren a inmunorreactividad endógena observada a fragmentos de anticuerpos segmentados. Esta inmunorreactividad endógena a proteínas endógenas segmentadas se denomina en la presente memoria "preinmunidad". Los anticuerpos implicados en la inmunorreactividad preinmunitaria se describieron inicialmente como "aglutinadores" o "anticuerpos anti-Fab" ("αFABA"). Se presenta que los anticuerpos preinmunitarios 1) están presentes en la mayoría de los individuos, 2) tienen concentraciones variables a través de una población, 3) no son IgM o factores reumatoides, 4) son específicos para fragmentos y 5) generalmente son de baja afinidad. Estos anticuerpos

ES 2 293 635 T3

pueden describirse generalmente como un grupo heterogéneo de anticuerpos que comparten las características de reconocer fragmentos proteínicos endógenos, habitualmente las porciones terminales de fragmentos de anticuerpo, que se exponen mediante degradación de proteínas, habitualmente degradación proteolítica.

5 Osterland, C.K. y otros, (1963) *Vos Sang* 8:133, presentan una actividad sérica capaz de “aglutinar” eritrocitos humanos revestidos con Fab o F(ab')₂. La reactividad se dirige a epítomos que solo se exponen después de que una inmunoglobulina sea segmentada por una enzima proteolítica. Esto es, estos anticuerpos reconocen la proteína degradada pero no la proteína intacta.

10 Waller, M. y otros, (1969) *Immunochemistry* 6:207-214, presentan que los “anticuerpos naturales” en suero humano eran capaces de diferenciar fragmentos Fab producidos por diferentes enzimas. Diferentes anticuerpos de este grupo eran específicos para diferentes epítomos en fragmentos Fab que se generaban, es decir, se exponían, mediante la segmentación específica que sufría un fragmento Fab específico.

15 Ling, N.R. y P. Drysdale, (1981) *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 66:459, presentan que fragmentos F(ab')₂ de paraproteínas policlonales humanas, bovinas y de conejo y de IgG humana de diferente subclase y tipo de cadena ligera se acoplaban a glóbulos rojos humanos y se usaban para detectar “anticuerpos aglutinadores” en suero humano normal y patológico. Se presentó que tales anticuerpos se producían comúnmente y demostraban heterogeneidad específica.

20 Persselin, J.E. y R.H. Stevens, (1985) *J. Clin. Invest.* 76:723, presentan que sueros de pacientes con artritis reumatoide contenían dos poblaciones de anticuerpos dirigidos contra la porción Fab de IgG humana reunida.

Heimer R. y otros, (mayo de 1985) *Arthritis and Rheumatism* 28(5):562, presentan un examen de la especificidad de anticuerpos anti-F(ab')₂ de IgG en sueros no fraccionados de pacientes con artritis reumatoide y procedentes de preparaciones de anticuerpos purificados por afinidad.

25 Persselin, J.E. y R.H. Stevens (1989) *Mongr. Allergy* 26:74, presentan un grupo de “anticuerpos autólogos” que se dirigen contra las porciones Fab y F(ab')₂ de IgG humana. Este grupo, que se presentó que era común en individuos normales y en pacientes que sufrían una variedad de trastornos, se caracterizó por ser un grupo heterogéneo de anticuerpos con diversas propiedades biológicas y especificidades elegidas como objetivo.

Aunque muchos de los informes de “anticuerpos naturales” se refieren a la existencia de tales anticuerpos que se unen específicamente a fragmentos de IgG, se cree que existen grupos de este tipo de anticuerpos que se unen a porciones degradadas de otras proteínas endógenas.

35 Jordan y otros, (*Circulation*, vol 86, no. 4, supl. 1, página I411) describen la producción del anticuerpo anti-Fab de GP IIb/IIIa quimérico c7E3.

Según se usan en la presente memoria, los términos “aglutinadores”, “anticuerpos aglutinantes”, “anticuerpos naturales”, “anticuerpos autólogos”, “anticuerpos preinmunitarios” y “anticuerpos séricos preinmunitarios” se usan intercambiamente y se entiende que se refieren a anticuerpos que están normalmente presentes en un individuo. Los anticuerpos preinmunitarios son un grupo heterólogo de anticuerpos que se unen a proteínas endógenas degradadas pero habitualmente no se unen a las intactas. Existen en bajos niveles y generalmente se unen a la porción terminal en un sitio de segmentación de una proteína endógena segmentada. Existen algunos anticuerpos preinmunitarios que reaccionan con proteínas intactas. Sin embargo, muchos de tales anticuerpos reconocen fragmentos pero no se unen a la proteína intacta. En los casos en los que no reaccionan cruzadamente con proteínas intactas, un anticuerpo preinmunitario generalmente reconoce un epítomo que está presente en la porción terminal de una proteína después de la segmentación. Este epítomo habitualmente se presenta en el extremo C. Presentándose en estas posiciones, el epítomo es extremadamente específico de modo que el epítomo solo es accesible y reconocible cuando aparece en el extremo de la proteína.

50 Se ha descubierto que la presencia, en un compuesto de otro modo inmunogénico, de una secuencia de aminoácidos que forma el epítomo para un anticuerpo preinmunitario reduce o elimina la inmunogenicidad de ese compuesto. La inclusión de tal secuencia de aminoácidos permite convertir un compuesto inmunogénico en un compuesto con inmunogenicidad reducida.

55 Según se usan en la presente memoria, los términos “secuencia autoantigénica”, “péptido autoantigénico”, “secuencia preinmunitaria”, “secuencia de aminoácidos preinmunitaria” y “péptido preinmunitario” se usan intercambiamente y se entiende que se refieren a una secuencia de aminoácidos que es un epítomo reconocido por un anticuerpo preinmunitario y que, cuando se asocia con un compuesto inmunogénico, hace al compuesto inmunogénico menos inmunogénico.

60 Según se usan en la presente memoria, los términos “compuestos de fusión”, “compuesto con inmunogenicidad reducida” y “compuestos menos inmunogénicos” se usan intercambiamente y se refieren a compuestos que comprenden un compuesto de otro modo inmunogénico conectado a una secuencia autoantigénica, con lo que la presencia de las secuencias autoantigénicas da como resultado la reducción o la eliminación de la inmunogenicidad del compuesto de otro modo inmunogénico. Cuando un compuesto inmunogénico, que es un compuesto que normalmente provoca una respuesta inmunitaria cuando se administra a un paciente, está conectado con una secuencia autoantigénica para

ES 2 293 635 T3

formar un compuesto de fusión, el compuesto de fusión no provoca respuesta inmunitaria o provoca una respuesta inmunitaria reducida cuando se administra a un paciente en comparación con la respuesta inmunitaria provocada por el compuesto inmunogénico por sí mismo.

5 Según se usa en la presente memoria, el término “menos inmunogénico” se refiere a la inmunogenicidad comparativamente reducida exhibida por un compuesto inmunogénico conectado a una secuencia autoantigénica con relación a la inmunogenicidad exhibida por el mismo compuesto inmunogénico que no está conectado a un compuesto autoantigénico.

10 Según se usa en la presente memoria, el término “inmunogénico” se refiere a la capacidad de un compuesto para provocar una respuesta inmunitaria.

15 Según se usa en la presente memoria, el término “antigénico” se refiere a la capacidad de un compuesto para reaccionar con el sistema inmunitario, es decir, los anticuerpos.

20 Las secuencias autoantigénicas pueden identificarse mediante una variedad de métodos que pueden ser fácilmente llevados a cabo por los que tienen experiencia normal en la especialidad. Proteínas endógenas, tales como anticuerpos, citoquinas, factores de crecimiento, receptores, enzimas y proteínas estructurales, pueden segmentarse mediante un grupo de enzimas proteolíticas. Los fragmentos producidos pueden exponerse a suero humano y esos fragmentos que se unen a anticuerpos preinmunitarios en el suero pueden identificarse fácilmente. La secuencia de aminoácidos del epítipo que está implicado en el anticuerpo preinmunitario puede determinarse. Este epítipo representa una secuencia autoantigénica. Alternativamente, pueden producirse bibliotecas de péptidos que contienen una variedad aleatoria de péptidos de aproximadamente 5 o más residuos de aminoácido. Estas bibliotecas pueden usarse en un rastreo con suero humano normal para identificar péptidos que son epítopos reconocidos por anticuerpos preinmunitarios endógenos. 25 Estos péptidos pueden identificarse y usarse o probarse como secuencias autoantigénicas.

30 Un ejemplo de un grupo heterogéneo de anticuerpos preinmunitarios específicos para productos de degradación de proteínas son anticuerpos que reconocen epítopos que están presentes en la secuencia C-terminal de la cadena pesada cuando anticuerpos IgG son degradados mediante segmentación proteolítica. De acuerdo con esto, algunas modalidades de la presente invención se refieren a un método para hacer a un compuesto de otro mono inmunogénico menos inmunogénico conectándolo a una de una variedad de secuencias autoantigénicas encontradas en el extremo C de la cadena pesada de moléculas de Fab o F(ab')₂ humanas o quiméricas.

35 Las secuencias de aminoácidos que son los epítopos para anticuerpos preinmunitarios anti-fragmento de IgG a menudo se encuentran en la región de bisagra de la cadena pesada. La segmentación de la cadena pesada en la región de bisagra genera una secuencia de aminoácidos en el extremo C que puede ser reconocida por anticuerpos preinmunitarios específicos que no reaccionan con moléculas de IgG intactas. Dependiendo de dónde se produce la segmentación, se expone un epítipo diferente y así un grupo diferente de anticuerpos preinmunitarios puede unirse a él. Así, anticuerpos individuales de este grupo reconocen los epítopos discretos producidos mediante segmentación en diversos sitios. 40

La secuencia autoantigénica se deriva de la región de bisagra de IgG. En algunas modalidades preferidas, las secuencias autoantigénicas se derivan de la región de bisagra de IgG₁.

45 La región de bisagra se refiere a diversos segmentos estructurales de la cadena pesada de moléculas de IgG. Diferentes clases de moléculas de IgG tienen diferentes secuencias de aminoácidos en sus regiones de bisagra respectivas. La región de bisagra es un elemento particularmente variable de la estructura de las inmunoglobulinas. La Tabla 1 proporciona un listado de las diferentes secuencias de aminoácidos de las regiones de bisagra respectivas de las diversas clases de moléculas de IgG.

50 Para identificar si una secuencia de aminoácidos particular es una secuencia autoantigénica, las moléculas de IgG pueden segmentarse, por ejemplo, con uno de un grupo de proteasas para proporcionar fragmentos de IgG que contienen diferentes secuencias de la región de bisagra en el extremo terminal. Alternativamente, pueden producirse péptidos y polipéptidos mediante tecnología de síntesis de péptidos o DNA recombinante que son modelados sobre la secuencia de la región de bisagra. En cualquier caso, pueden rastrearse sueros humanos para determinar si están presentes anticuerpos preinmunitarios que se unen a una secuencia terminal o un péptido sintético expuestos particulares, respectivamente. 55

Se ha observado que la secuencia de aminoácidos cerca del sitio de segmentación con papaína de moléculas de Fab humanas es reactiva con los anticuerpos preinmunitarios “anti-Fab” humanos endógenos. Esta secuencia puede 60 instruir al sistema inmunitario para ignorar a una molécula que incluye, de modo que no se provoque más respuesta inmunitaria. Esta secuencia autoantigénica evita la respuesta inmunitaria a un compuesto conectado que de otro modo sería inmunogénico.

65 Una secuencia preinmunitaria derivada de Fab que tiene la secuencia C-terminal CDKTH (N° ID SEC:1) se identificó a partir de observaciones realizadas relativas a la naturaleza de inmunidad humana preexistente y respuestas inmunitarias inducidas a fragmentos de Fab 7E3 múrido y quimérico. Las cadenas tanto pesada como ligera de Fab de 7E3 quimérico comprenden regiones variables múridas y regiones constantes humanas. Esta secuencia imita a un fragmento natural o la conformación de IgG humana encontrada en suero humano y, por lo tanto, no se monta una

ES 2 293 635 T3

respuesta inmunitaria de alta afinidad típica contra la molécula o contra la secuencia de Fab relacionada. Se observaba una inmunogenicidad reducida de la región variable de 7E3 murino cuando se conectaba a esta secuencia en la molécula de c7E3. De acuerdo con la invención, un compuesto inmunogénico, tal como una proteína extraña, puede hacerse no inmunogénico o menos inmunogénico conectando una secuencia autoantigénica, tales como las encontradas en el extremo C de moléculas de Fab humanas generadas por papaína derivadas de IgG₁, a un compuesto extraño. Así, la asociación de una secuencia autoantigénica con un agente terapéutico o diagnóstico inmunogénico es útil para reducir la inmunogenicidad del agente terapéutico o diagnóstico, evitando o reduciendo de ese modo una respuesta inmunitaria significativa al agente cuando se administra a un paciente. De forma similar, fragmentos Fab generados por papaína de anticuerpo quimérico c128 que es específico para CD4 y fragmentos Fab generados por papaína de anticuerpo quimérico c168 que es específico para factor de necrosis tumoral tienen la secuencia preinmunitaria, CDKTH (N° ID SEC:1), en sus extremos C.

Además, la segmentación de anticuerpos con regiones constantes humanas tales como c128, c168 o c7E3 con elastasa expone a una secuencia preinmunitaria en el extremo C del fragmento de anticuerpo así generado.

Se ha encontrado que el fragmento F(ab')₂ de 7E3 quimérico exhibe una característica similar a la molécula de Fab, tal como mostrar una inmunidad natural, o preinmunidad, en suero humano normal. Por lo tanto, la secuencia autoantigénica en su secuencia C-terminal también puede ser útil para reducir la inmunogenicidad de compuestos extraños en seres humanos.

Secuencias autoantigénicas preferidas pueden comprender secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: CDKTH (N° ID SEC:1), PKSCD (N° ID SEC:2), KSCDK (N° ID SEC:3), SCDKT (N° ID SEC:4), DKTHT (N° ID SEC:5), KTHTC (N° ID SEC:6), THTCP (N° ID SEC:7), HTPCP (N° ID SEC:8), TCPPC (N° ID SEC:9) y CPPCP (N° ID SEC:10). Estas secuencias pueden asociarse con el otro compuesto inmunogénico de tal modo que aseguren que el último residuo de cada secuencia particular represente un residuo de aminoácido C-terminal.

Para determinar si una secuencia de aminoácidos será útil como una secuencia autoantigénica, constructos que comprenden la secuencia específica que ha de probarse se exponen a suero humano para determinar si están presentes anticuerpos en suero que reconocen y se unen específicamente a la secuencia.

La secuencia autoantigénica más preferida comprende la secuencia de aminoácidos CDKTH (N° ID SEC:1). Según se apunta anteriormente, el residuo H es el residuo C-terminal de cualquier construcción que contenga este péptido. Cuando se asocia con una región variable de anticuerpo y está presente en la región C-terminal, este péptido reduce o elimina la inmunogenicidad de la región variable de anticuerpo, haciendo así menos inmunogénica a la región variable de anticuerpo.

Una vez identificada, una secuencia autoantigénica puede conectarse a una región variable de anticuerpo inmunogénico mediante una variedad de medios que pueden ser puestos en práctica fácilmente por los que tienen experiencia normal en la especialidad. Una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia autoantigénica puede conectarse a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de anticuerpo inmunogénico para formar un gen quimérico que codifica una proteína de fusión. La secuencia autoantigénica aparecerá en la porción terminal de la proteína de fusión resultante cuando el gen quimérico se exprese. Estos péptidos pueden conectarse químicamente a la región variable de anticuerpo inmunogénico usando técnicas bien conocidas. Las secuencias autoantigénicas también pueden conectarse a una región variable de anticuerpo por medios químicos. Independientemente del método para conectar una secuencia autoantigénica a una región variable de anticuerpo de otro modo inmunogénico, la región variable de anticuerpo inmunogénico se convierte en una región variable de anticuerpo con inmunogenicidad reducida mediante la incorporación de una secuencia autoantigénica que sirve como un epítipo para anticuerpos preinmunitarios. Un experto normal en la especialidad puede efectuar la conexión de una secuencia autoantigénica a una región variable de anticuerpo inmunogénico mediante técnicas bien conocidas. Técnicas de acoplamiento estándar, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a: acoplamiento a través de sulfhidrilo libre de cisteína, acoplamiento a través de un grupo amino en ε de lisina y acoplamiento a través de cualquier amina libre. Las técnicas para someter a ingeniería los anticuerpos son bien conocidas y se describen en Winter y Millstein (1991) *Nature* 349:293 y Larrich y Fry (1991) *Hum. Antibod. and Hybridomas* 2:17.

De acuerdo con la invención, una secuencia autoantigénica puede enlazarse a una región variable de anticuerpo inmunogénico para convertir la región variable de anticuerpo inmunogénico en una región variable de anticuerpo de inmunogenicidad reducida. Según se usan en la presente memoria, los términos “compuestos de inmunogenicidad reducida”, “compuestos menos inmunogénicos”, “compuestos no inmunogénicos” y “compuestos de fusión” se usan intercambiabilmente y pretenden referirse a una región variable de anticuerpo que comprende una secuencia autoantigénica conectada a una región variable de anticuerpo de otro modo inmunogénico. La presencia de la secuencia autoantigénica conectada a la región variable de anticuerpo de otro modo inmunogénico provoca una respuesta inmunitaria reducida en individuos a los que se administra tal región variable de anticuerpo con relación a la respuesta inmunitaria provocada por la región variable de anticuerpo inmunogénico estando ausente la secuencia autoantigénica. Una secuencia autoantigénica puede añadirse a Fabs no humanos procesados o Fabs humanos producidos recombinantemente.

Un compuesto inmunogénico preferido que ha de convertirse en un compuesto de inmunogenicidad reducida de acuerdo con la presente invención es una región variable de anticuerpo IgG murino. Normalmente, una región variable de anticuerpo IgG murino provocará una respuesta inmunitaria cuando se administre a un ser humano. Esta respuesta

ES 2 293 635 T3

puede hacerla ineficaz o menos eficaz debido a que la molécula de la región variable de anticuerpo de IgG es neutralizada y/o retirada antes de alcanzar y unirse a su antígeno diana. Haciendo menos inmunogénica a la región variable de anticuerpo IgG múrido, se hace más eficaz como un compuesto terapéutico o diagnóstico ya que es menos refrenada por el sistema inmunitario del paciente.

Una modalidad preferida de la presente invención es una molécula de IgG múrida que tiene una secuencia autoantigénica que comprende CDKTH (Nº ID SEC:1) conectada de modo que el residuo H sea un residuo C-terminal. De acuerdo con la invención, tal molécula puede producirse mediante técnicas de DNA recombinante estándar usadas para producir anticuerpos. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia autoantigénica puede insertarse en el extremo 3' de un gen que codifica una porción C-terminal de la molécula de IgG, preferiblemente la porción C-terminal de la cadena pesada. La secuencia de nucleótidos se inserta en el marco de lectura apropiado de modo que los residuos codificados por ella se presenten totalmente en el extremo de la proteína resultante.

Los resultados clínicos demuestran una reducción en la inmunogenicidad para antígenos extraños que contienen una secuencia autoantigénica que es expuesta mediante la segmentación proteolítica de una cadena pesada de IgG. Se han hecho varias observaciones durante el desarrollo del Mab antiplaquetario terapéutico 7E3 que conducen al descubrimiento de que la inmunogenicidad de un compuesto normalmente inmunogénico puede reducirse asociándolo con una secuencia de aminoácidos que representa un epítipo reconocido por un anticuerpo preinmunitario. Estos experimentos se presentan en el Ejemplo 1.

Brevemente, se inyectó Mab 7E3 en seres humanos como un fragmento Fab múrido y también como un fragmento Fab quimérico (c7E3). Se analizó la inmunogenicidad de ambos fragmentos. Existía una diferencia fundamental en la naturaleza de las respuestas inmunitarias provocadas por los Fabs múrido y quimérico. El Fab de 7E3 múrido provocaba una respuesta inmunitaria en pacientes que se dirigía totalmente contra la región variable de 7E3. En contraste, aunque el Fab de c7E3 contenía la región variable idéntica al Fab de 7E3 múrido, c7E3 no provocaba respuestas inmunitarias comparables, indicando que la región constante humana del Fab de c7E3 hacía a la región variable menos inmunogénica.

Análisis de EIA independientes de afinidad con revestimiento directo indicaban que 50-80% de la población humana normal tiene anticuerpos séricos preinmunitarios que reaccionan con fragmentos Fab quiméricos. Esta reactividad preinmunitaria no es específica para las regiones variables de estas moléculas ya que diversos fragmentos Fab quiméricos monoclonales así como fragmentos Fab voluminosos preparados a partir de Ig sérica humana total eran reconocidos por los anticuerpos anti-Fab endógenos. Esta reactividad anti-Fab parecía ser de baja afinidad y era detectable solo mediante ensayos de EIA en fase sólida relativamente sensibles.

La localización de los epítopos reactivos de los Fabs quiméricos (o humanos) monoclonales estaba en el extremo C de la cadena pesada del fragmento Fab generado por digestión con papaína de la molécula de IgG intacta. Estos anticuerpos preinmunitarios anti-Fab de 7E3 quimérico endógenos se neutralizaron fácilmente usando el fragmento Fab de otro anticuerpo quimérico IgG₁ pero no mediante otras proteínas. Estas observaciones indicaban que el epítipo reactivo es probablemente una secuencia corta de aminoácidos que debe estar presente en o cerca del extremo C del fragmento Fab.

Un fragmento Fab humano quimérico imita a una molécula que se encuentra normalmente en suero y que provoca una respuesta de anticuerpo de baja afinidad normal. Parece que la respuesta inmunitaria contra moléculas que contienen la secuencia autoantigénica como un epítipo accesible puede regularse para impedir una respuesta secundaria de alta afinidad. En efecto, el sistema inmunitario puede desensibilizarse o hacerse tolerante a la estimulación antigénica con moléculas que tienen el epítipo. Por lo tanto, una estimulación adicional con una molécula similar no conduciría a una respuesta inmunitaria de alta afinidad típica.

La preinmunidad para un epítipo particular parece ser específica de la especie. Cuando se analizaban las respuestas inmunitarias de primates tratados con Fab de 7E3 quimérico, los sueros de pretratamientos procedentes de estos monos demostraban poca o ninguna inmunorreactividad con Fab de 7E3 quimérico pero mostraban una reactividad significativa con fragmentos Fab generados de IgG de mono. A la inversa, el suero humano no mostraba inmunorreactividad preexistente con Fab de mono. Además, los monos han demostrado una inmunogenicidad inducida significativamente mayor a Fab de 7E3 quimérico que los seres humanos enrolados en experimentos clínicos de Fase 1.

También se examinaron otras especies con respecto a inmunorreactividad preexistente para sus fragmentos Fab y F(ab')₂ autólogos. Grupos autólogos de sueros de conejos y cabras se rastrearon con respecto a la reactividad hacia fragmentos Fab y F(ab')₂ policlonales procedentes de IgG de sus especies respectivas. De nuevo, se observó que existía una reactividad IgG significativa hacia ambos de estos fragmentos de anticuerpo procedentes de sus propias especies. Sin embargo, no se hizo la misma observación para anticuerpos múridos hacia Fab de 7E3 múrido.

Aunque no se han realizado experimentos comparativos sobre seres humanos usando fragmentos F(ab')₂ de 7E3 múridos y quiméricos u otros fragmentos Fab y F(ab')₂ múridos y quiméricos, se han observado anticuerpos específicos que se unen a fragmentos Fab y F(ab')₂ humanos. Los individuos con alta reactividad anti-Fab quimérico no tienen necesariamente alta reactividad anti-F(ab')₂ quimérico, y viceversa. Por otra parte el reconocimiento inmunitario de estos fragmentos quiméricos es aparentemente específico, ya que la unión de anticuerpos anti-Fab generalmente no puede bloquearse mediante Fab' o F(ab')₂ quiméricos.

ES 2 293 635 T3

La descripción de la presente invención se presenta generalmente en la presente memoria en relación con compuestos que son no inmunogénicos como resultado de conectar una secuencia autoantigénica humana a un compuesto de otro modo inmunogénico, y a un método para reducir la inmunogenicidad de compuestos conectando el compuesto inmunogénico con una secuencia autoantigénica humana. Se contempla que la presente invención puede aplicarse a otras especies. El alcance de la presente invención pretende extenderse a compuestos que son menos inmunogénicos en una especie particular como resultado de conectar una secuencia autoantigénica procedente de la especie a un compuesto de otro modo inmunogénico y a un método para reducir la inmunogenicidad de compuestos en una especie particular conectando el compuesto inmunogénico con una secuencia autoantigénica procedente de esa especie.

Por otra parte, la descripción de la presente invención se presenta con relación a compuestos en los que una secuencia autoantigénica se enlaza físicamente a un compuesto de otro modo inmunogénico. Sin embargo, es posible que no se requiera conexión física.

15 Ejemplos

Ejemplo 1

El anticuerpo monoclonal 7E3 se ha desarrollado para terapia de seres humanos como un fragmento Fab de la molécula de anticuerpo. El reactivo se produjo en dos versiones; una derivada del anticuerpo monoclonal murino (isotipo gamma 1 murino) mediante digestión con papaína (7E3) y una derivada de un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/ser humano (isotipo gamma 1 humano) también mediante digestión con papaína (c7E3). El Mab quimérico se produjo usando técnicas de clonación estándar para obtener la región variable procedente del hibridoma 7E3 y fusionándola a genes de la región constante humanos clonados previamente *in vitro*. Los genes quiméricos se introdujeron en células mamíferas apropiadas para la expresión.

Las dos moléculas de Fab tienen la misma región variable, pero diferentes regiones constantes. Las secuencias de aminoácidos C-terminales expuestas después de la digestión con papaína son diferentes. La papaína sujeta las moléculas de anticuerpo en la región de bisagra de la cadena pesada entre el dominio CH1 y CH2. Las secuencias de aminoácidos de bisagra de la gamma 1 humana y la gamma 1 de ratón son muy diferentes (véase la Tabla 1). Después de la segmentación de c7E3 con papaína, el extremo C de la cadena pesada termina en los aminoácidos CDKTH (Nº ID SEC:1). El punto de segmentación exacto de la papaína en la bisagra de gamma 1 de ratón es desconocido, pero debe producir un extremo C muy diferente de la secuencia humana, ya que la bisagra de ratón no contiene una secuencia similar a CDKTH (Nº ID SEC: 1).

Los fragmentos Fab de m7E3 y c7E3 se probaron para determinar si el suero humano contiene anticuerpos que reaccionan con los fragmentos. Se usó un ensayo ELISA en fase sólida en el que bien Fab de m7E3 o bien Fab de c7E3 se inmovilizaba directamente sobre una placa de ensayo de plástico y se exponía a suero humano. Los anticuerpos humanos unidos se detectaron usando anticuerpos antihumanos de cabra conjugados a una enzima que producirá un producto coloreado cuando se incuba con el sustrato apropiado. Este ensayo es muy sensible y capaz de detectar interacciones de baja afinidad. Se probó un gran número de sueros humanos y el Fab de m7E3 generalmente era no reactivo, mientras que el Fab de c7E3 reaccionaba con al menos 60% de las muestras de suero humano.

La especificidad de los anticuerpos reactivos en suero humano se determinó incluyendo un exceso de diversas moléculas en el ensayo como inhibidores competitivos. Si una molécula dada inhibe la unión a c7E3, entonces también debe presentar el epítipo o los epítipos reactivos. Según se espera, c7E3 soluble podía inhibir la unión de los anticuerpos humanos a c7E3 inmovilizado. Otras moléculas que podían inhibir la unión incluían fragmentos Fab de otros anticuerpos gamma 1 quiméricos, y Fab humano policlonal derivado de suero. En contraste, ninguna de las siguientes moléculas podía inhibir la unión: 1) Fab de m7E3; 2) IgG de c7E3 entera; 3) fragmento Fab derivado de la versión IgG₄ de 7E3 (contiene una región de bisagra diferente de gamma 1); 4) fragmento F(ab')₂ de c7E3; y 5) fragmento Fab' de c7E3. El fragmento Fab es extremadamente específico para el extremo C expuesto después de la digestión con papaína del anticuerpo c7E3.

Las inmunogenicidades de Fab de m7E3 y Fab de c7E3 se probaron en seres humanos en experimentos clínicos de Fase I. Usando un formato de ensayo que minimiza la reactividad preinmunitaria de baja afinidad de modo que pueden observarse fácilmente respuestas relacionadas con el tratamiento reales, se encontró que 17/86 o aproximadamente 20% de los sujetos que recibían Fab de m7E3 exhibían respuestas inmunitarias con concentraciones que variaban de 1:50-1:1600. En contraste, solo 1/67 ó 1,5% de los sujetos que recibían Fab de c7E3 exhibían una respuesta inmunitaria (concentración = 1:50). Por lo tanto, se observó que el Fab de c7E3, que reacciona con anticuerpos humanos endógenos, era mucho menos inmunogénico que Fab de m7E3, que no reacciona con anticuerpos endógenos.

Ejemplo 2

Las posibles secuencias derivadas de la región de bisagra de Fab (y F(ab')₂) gamma 1 humano reactivo con anticuerpos preinmunitarios "antifragmento" endógenos pueden identificarse mediante experimentos de rastreo y competición usando péptidos sintéticos. Se producen péptidos sintéticos de aproximadamente 5 aminoácidos o más de longitud que contienen diversas secuencias encontradas en la secuencia de aminoácidos de la región de bisagra.

ES 2 293 635 T3

Las secuencias más reactivas pueden conectarse a continuación a un compuesto inmunogénico de interés para reducir la inmunogenicidad. La conexión puede efectuarse de varios modos. Si el compuesto inmunogénico es una proteína, el extremo C natural de la proteína inmunogénica puede convertirse en la secuencia deseada mediante mutagénesis dirigida al sitio del gen, efectuado lo más fácilmente usando cebadores de PCR diseñados apropiadamente para someter a delección el codón de terminación natural y añadir la secuencia deseada. Estas técnicas podrían usarse para añadir o substituir la secuencia en cualquier posición en cualquier gen. Alternativamente, puede construirse un péptido sintético correspondiente a la secuencia reactiva mínima y podría conectarse al compuesto inmunogénico por medios químicos.

10 Ejemplo 3

Secuencias de aminoácidos que son reactivas con anticuerpos en suero humano normal, que pueden usarse como secuencias autoantigénicas para hacer a las moléculas extrañas o normalmente inmunogénicas menos inmunogénicas, pueden identificarse rastreando péptidos sintéticos con sueros humanos. Este es un método general que no requiere la identificación de un sitio de segmentación específico para proteasa de una proteína endógena y ni siquiera requiere que la secuencia real esté presente en la naturaleza.

Brevemente, se genera una biblioteca de péptidos aleatorios de al menos aproximadamente 5 o más y preferiblemente aproximadamente 5-10 aminoácidos de longitud. Estos péptidos se rastrean con respecto a la reactividad con anticuerpos en sueros humanos. Esto se efectúa, por ejemplo, inmovilizando los péptidos sobre una fase sólida y realizando un ensayo de ELISA estándar para detectar anticuerpos humanos unidos después de la exposición a los sueros.

Los péptidos positivos se evalúan a continuación adicionalmente para establecer si son reactivos solo con sueros humanos y no con otras especies, y para determinar la afinidad de las interacciones. Los péptidos que reaccionan con la mayoría de los sueros humanos pero no con sueros de otras especies se estudian a continuación para determinar si son capaces de conferir inmunogenicidad reducida a compuestos de otro modo inmunogénicos. Que un péptido dado provoque o no una respuesta inmunitaria requiere datos de inmunogenicidad empíricos.

Existen muchos modos posibles de generar y rastrear bibliotecas o secuencias de péptidos aleatorios. Un método es sintetizar colecciones de péptidos (Schoofs, P.G. y otros, (1988) Immun. 140:611) y ensayar las fracciones reunidas con respecto a la reactividad contra suero humano. Las fracciones reunidas positivas se subdividen y se reensayan múltiples veces de modo que la especie activa se identificara finalmente. Otro método es generar una secuencia de DNA que codifica para segmentos de aminoácidos aleatorios y fusionar las secuencias de DNA a un gen de bacteriófago (McCafferty y otros, (1990) Nature 348:552). Las secuencias de aminoácidos aleatorios se presentan en el exterior de la partícula de bacteriófago como un extremo C artificial de una proteína fágica. El fago se inmoviliza y se rastrea con respecto a la reactividad con anticuerpos humanos endógenos. El fago positivo se aísla y el DNA se extrae y se somete a secuenciación para determinar la secuencia de aminoácidos del segmento peptídico reactivo.

40 Ejemplo 4

En general, es difícil en la práctica probar candidatos de secuencias autoantigénicas en seres humanos para determinar si su presencia hace o no a los compuestos inmunogénicos menos inmunogénicos debido a que requiere la prueba experimental en seres humanos lo que produce problemas éticos en muchas circunstancias. Debido a esta dificultad para probar la inmunogenicidad de posibles moléculas en seres humanos, se usa un modelo de conejo para imitar el sistema humano y demostrar que epítopos de anticuerpos preinmunitarios pueden identificarse y conectarse a compuestos inmunogénicos para reducir la inmunogenicidad de los compuestos.

Epítopos de anticuerpos preinmunitarios pueden identificarse como se describe en el Ejemplo 3, pero substituyendo por sueros de conejo los sueros humanos usados en los protocolos descritos en la presente memoria. Secuencias de aminoácidos que reaccionan con los anticuerpos endógenos pueden identificarse y conectarse a diversos compuestos mediante métodos bien conocidos. Pueden generarse datos comparativos a partir de experimentos en los que los compuestos conectados a las secuencias autoantigénicas sospechadas y compuestos solos se administran a conejos. La respuesta inmunitaria contra cada uno de los compuestos puede medirse.

Se ha observado que los conejos exhiben el mismo tipo de reactividad normal con fragmentos Fab homólogos; esto es, preinmunidad para fragmentos Fab. La región apropiada de DNA de conejo procedente del locus de la cadena pesada de inmunoglobulina se clona y se determina la secuencia de la región de bisagra. Esto permite la construcción de un compuesto de fusión que comprende una secuencia autoantigénica de conejo conectada a la IgG de 7E3 quimérico en el extremo C de una molécula de Fab y evaluar su inmunogenicidad en comparación con la inmunogenicidad de Fab de 7E3 quimérico en conejos.

60 Ejemplo 5

La estreptoquinasa es una proteína trombolítica que se ha probado como un fármaco para pacientes con ataque cardíaco que sufren bloqueos coronarios. Una desventaja principal de la estreptoquinasa es que es altamente inmunogénica en seres humanos. De acuerdo con esto, su utilidad está muy limitada. Particularmente, una vez que a un paciente se le ha administrado estreptoquinasa, existe la posibilidad de una reacción inmunitaria peligrosa a cualquier administración subsiguiente.

ES 2 293 635 T3

La presente invención proporciona un método para reducir la inmunogenicidad de la estreptoquinasa, reduciendo de ese modo las desventajas inherentes de la molécula como un agente terapéutico que forma la base para los problemas de seguridad que están asociados con su uso.

5 La producción de estreptoquinasa usando tecnología de DNA recombinante es bien conocida y puede ser realizada por los que tienen experiencia normal en la especialidad usando materiales de partida fácilmente disponibles. De forma similar, pueden realizarse técnicas bien conocidas para producir un derivado de estreptoquinasa que tiene la secuencia autoantigénica CDKTH (N° ID SEC:1) en el extremo C de la proteína. Un experto normal en la especialidad puede producir tal derivado de estreptoquinasa sin una experimentación excesiva.

10 El derivado de estreptoquinasa puede probarse *in vitro* y en modelos animales para asegurar que retiene actividad de estreptoquinasa. Pueden realizarse a continuación experimentos clínicos comparativos para medir la inmunogenicidad de estreptoquinasa frente a la inmunogenicidad de un derivado de estreptoquinasa. Las técnicas para realizar estos experimentos son bien conocidas y pueden ser realizadas fácilmente por los que tienen experiencia normal en la especialidad.

Ejemplo 6

20 Existen varios ejemplos de Mabs quiméricos que provocan respuestas inmunitarias dirigidas contra las regiones variables. Estos incluyen B72.3 (Meredith y otros, (1992) J. Nucl. Medicine 33:23-29) y ch14.18 (Saleh y otros, (1992) Hum. Antibody Hybridoma 3:19-24). El hecho de que estos anticuerpos provoquen respuestas inmunitarias representa un obstáculo principal en su eficacia y su utilidad está muy limitada por su inmunogenicidad. Particularmente, los pacientes desarrollan anticuerpos contra los anticuerpos y neutralizan su actividad.

25 La presente invención proporciona un método para reducir la inmunogenicidad de Mabs quiméricos, reduciendo de ese modo la base para los problemas de seguridad que están asociados con su uso e incrementando su utilidad. Técnicas para someter a ingeniería los anticuerpos son descritas en Winter y Millstein (1991) Nature 349:293 y Larrich y Fry (1991) Hum. Antibod. and Hybridomas 2:17. La producción de B72.3 y ch14.18 puede efectuarse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando tecnología de DNA recombinante bien conocida por los que tienen experiencia normal en la especialidad. Asimismo, pueden realizarse técnicas bien conocidas para producir derivados de Mab quiméricos dB72.3 y dch14.18 en los que la secuencia autoantigénica CDKTH (N° ID SEC:1) está presente en el extremo C de cada anticuerpo, respectivamente, preferiblemente la cadena pesada. Un experto normal en la especialidad puede producir tales Mabs quiméricos y derivados de Mabs quiméricos sin experimentación excesiva.

35 Los derivados de Mabs quiméricos dB72.3 y dch14.18 pueden probarse *in vitro* y en modelos animales para asegurar que retienen su especificidad y actividad. Pueden realizarse experimentos clínicos comparativos para medir la inmunogenicidad de Mabs quiméricos B72.3 y ch14.18 frente a la inmunogenicidad de derivados de Mabs quiméricos dB72.3 y dch14.18, respectivamente. Las técnicas para realizar estos experimentos son bien conocidas y pueden ser realizadas fácilmente por los que tienen experiencia normal en la especialidad.

40

TABLA 1

Secuencias de Bisagra de Inmunoglobulinas de Ser Humano y Ratón	
Tipo de anticuerpo	Secuencia de Bisagra
IgG ₁ humana	EPKSCDKTHTCPPCP (N° ID SEC: 11)
IgG ₂ humana	ERKCCVECP (N° ID SEC: 12)
IgG ₃ humana	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (N° ID SEC: 13)
IgG ₃ M15 humana	EPKSCDTPPPCPRCP (N° ID SEC: 14)
IgG ₄ humana	ESKYGPPCP (S/P)CP (N° ID SEC: 15)
IgG ₁ de ratón	VPRDCGCKPCICT (N° ID SEC: 16)
IgG _{2e} de ratón	EPRGPTIKPCPPCKCP (N° ID SEC: 17)

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la inmunogenicidad de una región variable de anticuerpo inmunogénico en un ser humano, que comprende:

- a) seleccionar una secuencia autoantigénica de uno o más fragmentos proteínicos y/o péptidos que son reconocidos por anticuerpo preinmunitario humano, en donde dicha secuencia autoantigénica comprende una secuencia de aminoácidos carboxiterminal que forma un epítipo reconocido por dicho anticuerpo preinmunitario humano; y
- b) conectar dicha región variable de anticuerpo inmunogénico al extremo amino de dicha secuencia autoantigénica, no estando conectado el extremo carboxi de dicha secuencia autoantigénica,

con lo que se produce un compuesto de fusión que tiene inmunogenicidad reducida en un ser humano con relación a dicha región variable de anticuerpo inmunogénico, en donde el compuesto de fusión que tiene inmunogenicidad reducida en un ser humano no es Fab de c7E3.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia autoantigénica se selecciona en a) combinando anticuerpo preinmunitario y uno o más fragmentos proteínicos y/o péptidos, y seleccionando una secuencia autoantigénica que es reconocida por dicho anticuerpo preinmunitario humano de uno o más fragmentos proteínicos y/o péptidos.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha secuencia autoantigénica se selecciona en a) combinando anticuerpo preinmunitario humano y uno o más fragmentos de IgG humana que contienen secuencias de la región de bisagra en el extremo terminal y/o péptidos procedentes de la región de bisagra de una IgG humana, y seleccionando una secuencia autoantigénica que es reconocida por dicho anticuerpo preinmunitario humano de dichos uno o más fragmentos y/o péptidos de IgG.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha región variable de anticuerpo es una región variable de anticuerpo no humano.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha región variable de anticuerpo no humano es una región variable de un anticuerpo monoclonal múrido.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha secuencia autoantigénica está presente en el extremo C de un fragmento de una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG humana.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha secuencia autoantigénica se deriva de la región de bisagra de una IgG1 humana.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha secuencia autoantigénica se deriva de la región de bisagra de una IgG humana.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha secuencia autoantigénica es un fragmento de una proteína humana que tiene un extremo carboxi producido mediante la segmentación de la proteína humana con una enzima proteolítica.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el extremo carboxi de dicha secuencia autoantigénica consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: N° ID SEC:1, N° ID SEC:2, N° ID SEC:3, N° ID SEC:4, N° ID SEC:5, N° ID SEC:6, N° ID SEC:7, N° ID SEC:8, N° ID SEC:9 y N° ID SEC:10.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha secuencia autoantigénica se conecta a dicho compuesto inmunogénico conectando químicamente un péptido que comprende dicha secuencia autoantigénica a dicho compuesto inmunogénico.

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la conexión de la región variable de anticuerpo inmunogénico a la secuencia autoantigénica comprende expresar un gen quimérico que codifica una proteína de fusión, comprendiendo dicho gen quimérico una primera secuencia de nucleótidos que codifica dicha región variable de anticuerpo inmunogénico y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia autoantigénica, de modo que la expresión de dicho gen quimérico produzca una proteína de fusión que tiene dicha secuencia autoantigénica conectada a dicha región variable de anticuerpo inmunogénico.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha segunda secuencia de nucleótidos está unida al extremo 3'-terminal de dicha primera secuencia de nucleótidos.

ES 2 293 635 T3

14. Un método para reducir la inmunogenicidad de una región variable de un anticuerpo monoclonal múrido en un ser humano, que comprende:

5 a) combinar anticuerpo preinmunitario humano y uno o más fragmentos de IgG humana que contienen secuencias de región de bisagra en el extremo terminal y/o péptidos procedentes de la región de bisagra de una IgG humana, y seleccionar una secuencia autoantigénica que es reconocida por dicho anticuerpo preinmunitario humano procedente de dichos uno o más fragmentos y/o péptidos de IgG,

10 en donde dicha secuencia autoantigénica comprende una secuencia de aminoácidos carboxiterminal que forma un epítipo reconocido por dicho anticuerpo preinmunitario humano; y

b) conectar dicha región variable al extremo amino de dicha secuencia autoantigénica, no estando conectado el extremo carboxi de dicha secuencia autoantigénica,

15 con lo que se produce un compuesto de fusión que tiene inmunogenicidad reducida con relación a dicha región variable de un anticuerpo monoclonal múrido, en donde dicho compuesto de fusión que tiene inmunogenicidad reducida no es Fab de c7E3.

20 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha IgG humana es IgG1 humana.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicha secuencia autoantigénica es el N° ID SEC:1, N° ID SEC:2, N° ID SEC:3, N° ID SEC:4 o N° ID SEC:5.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 293 635 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:1:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
10 (C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:1:
Cys Asp Lys Thr His
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
25 (B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:2:
Pro Lys Ser Cys Asp
35 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:3:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
45 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:3:
50 Lys Ser Cys Asp Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:4:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
60 (C) TIPO DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:4:

ES 2 293 635 T3

Ser Cys Asp Lys Thr
1 5

5 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:5:

20 Asp Lys Thr His Thr
1 5

20 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:6:

35 Lys Thr His Thr Cys
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:7:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

45 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:7:

Thr His Thr Cys Pro
1 5

55 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:8:

ES 2 293 635 T3

His Thr Cys Pro Pro
1 5

5 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:9:

Thr Cys Pro Pro Cys
1 5

20 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:10:

35 Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:11:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

45 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:11:

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

55 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

60 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:12:

ES 2 293 635 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Xaa Cys Pro
1 5 10

5 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:16:

Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
1 5 10

20 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:17:

35 Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
1 5 10 15

40

45

50

55

60

65