



(10) **DE 693 30 523 T3** 2010.10.28

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 656 946 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 30 523.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP93/02214**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 919 098.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/004678**
(86) PCT-Anmeldetag: **18.08.1993**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.03.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.1995**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **01.08.2001**
(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **31.03.2010**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.10.2010**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/13** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

<p>(30) Unionspriorität:</p> <table><tr><td>92402326</td><td>21.08.1992</td><td>EP</td></tr><tr><td>93401310</td><td>21.05.1993</td><td>EP</td></tr></table> <p>(73) Patentinhaber: Vrije Universiteit Brussel, Brüssel/Bruxelles, BE</p> <p>(74) Vertreter: WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und Rechtsanwälte, 81541 München</p>	92402326	21.08.1992	EP	93401310	21.05.1993	EP	<p>(84) Benannte Vertragsstaaten: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE</p> <p>(72) Erfinder: Casterman, Cecile, 1640 Sint-Genesius-Rode, BE; Hamers, Raymond, 1640 Sint-Genesius-Rode, BE</p>
92402326	21.08.1992	EP					
93401310	21.05.1993	EP					

(54) Bezeichnung: **IMMUNOGLOBULINE OHNE LEICHTE KETTEN**

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft neue isolierte Immunglobuline, welchen die leichten Polypeptidketten fehlen. Diese Immunglobuline bestehen nicht aus den Abbauprodukten von Immunglobulinen, die sowohl aus schweren Polypeptid- und leichten Polypeptidketten zusammengesetzt sind, sondern die Erfindung definiert im Gegensatz dazu ein neues Mitglied der Familie der Immunglobuline, insbesondere einen neuen Typ von Molekülen, die in der Lage sind, an der Immunerkennung teilzunehmen. Solche Immunglobuline können für mehrere Zwecke, insbesondere zur Diagnose oder für therapeutische Zwecke, einschließlich einem Schutz gegenüber pathologischen Agenzien oder der Regulation der Expression oder Aktivität von Proteinen verwendet werden.

[0002] Bisher besteht die Struktur, welche für Immunglobuline vorgeschlagen wurde, aus einem Modell mit vier Ketten, was sich auf das Vorliegen von zwei identischen leichten Polypeptidketten (leichte Ketten) und zwei identischen schweren Polypeptidketten (schwere Ketten) bezieht, die durch Disulfidbindungen miteinander verbunden sind, um γ - oder T-förmige Makromoleküle zu bilden. Diese Ketten sind aus einem konstanten Bereich und einem variablen Bereich zusammengesetzt, wobei der konstante Bereich in mehrere Domänen unterteilt ist. Die zwei schweren Polypeptidketten sind gewöhnlich durch Disulfidbindungen in einer sogenannten "Gelenkregion" verknüpft, welche zwischen der ersten und zweiten Domäne des konstanten Bereichs gelegen ist.

[0003] Von den Proteinen, welche die Klasse der Immunglobuline bilden, sind die meisten von diesen Antikörper und präsentieren dementsprechend eine Antigenbindungsstelle oder mehrere Antigenbindungsstellen.

[0004] Gemäß dem Modell mit vier Ketten ist die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers in den variablen Domänen von jeweils den schweren und leichten Ketten lokalisiert und erfordert die Assoziation der variablen Domänen der schweren und der leichten Ketten.

[0005] Für die Definition dieser Immunglobuline nach dem Vier-Ketten-Modell wird auf Roitt, I, et al. (Immunology, zweite Ausgabe, Gower Medical Publishing USA, 1989) Bezug genommen. Bezug genommen wird insbesondere auf den Teil, welcher die Definition der Immunglobuline mit vier Ketten, deren Polypeptid- und genetische Strukturen, die Definition von deren variablen und konstanten Bereichen und den Erhalt der Fragmente, die durch enzymatischen Abbau gemäß wohlbekannten Techniken erzeugt werden, betrifft.

[0006] Die Erfinder haben überraschend festgestellt, daß andere Moleküle aus Tieren isoliert werden können, welche diese von Natur aus produzieren, wobei die Moleküle funktionale Eigenschaften von Immunglobulinen aufweisen, wobei diese Funktionen in manchen Fällen mit Strukturelementen verbunden sind, welche beispielsweise aufgrund des Fehlens von leichten Ketten von jenen verschieden sind, die an der Funktion der Immunglobuline mit vier Ketten beteiligt sind.

[0007] Die Erfindung betrifft Immunglobuline eines Modells mit zwei Ketten, welche weder Fragmenten entsprechen, die beispielsweise durch den Abbau, insbesondere den enzymatischen Abbau eines natürlichen Immunglobulins des Modells mit vier Ketten erhalten werden, noch der Expression in Wirtszellen einer DNA entsprechen, die für den konstanten oder den variablen Bereich eines natürlichen Immunglobulins des Modells mit vier Ketten oder einen Teil dieser Bereiche codiert, noch Antikörpern entsprechen, die bei Lymphopathien z. B. in Mäusen, Ratten oder Menschen erzeugt werden.

[0008] E. S. Ward et al. (1) haben einige Experimente beschrieben, die mit variablen Domänen von schweren Polypeptidketten oder/und leichten Polypeptidketten (V_K/F_V) durchgeführt wurden, um die Fähigkeit dieser variablen Domänen zu testen, spezifische Antigene zu binden. Zu diesem Zweck wurde eine Bibliothek von V_H -Genen aus der genomischen DNA der Milz von Mäusen hergestellt, welche vorher mit diesen spezifischen Antigenen immunisiert wurden.

[0009] Ward et al. haben in ihrer Veröffentlichung beschrieben, daß V_H -Domänen vermutlich aufgrund der exponierten hydrophoben Oberfläche, die normalerweise durch die V_K - oder V_L -Domänen abgedeckt wird, relativ klebrig sind. Sie stellen sich folglich vor, daß es möglich sein sollte, V_H -Domänen mit verbesserten Eigenschaften zu entwerfen, und daß weiterhin V_H -Domänen mit Bindungsaktivitäten als Bausteine zur Erzeugung variabler Fragmente (Fv-Fragmente) oder vollständiger Antikörper dienen könnten.

[0010] Die Veröffentlichung von Blier P. R. et al. (The Journal of Immunology, Band 139, 3996–4006, Nr. 12, 15. Dezember 1987) offenbart die unvollständigen, aus Hybridom erhaltenen Nukleotidsequenzen.

[0011] Die Erfindung geht nicht von der Idee aus, daß die verschiedenen Fragmente (leichte und schwere Ketten) und die verschiedenen Domänen dieser Fragmente eines Immunglobulins nach dem Vier-Ketten-Modell modifiziert werden können, um neue oder verbesserte Antigenbindungsstellen eines Immunglobulins nach dem Vier-Ketten-Modell zu definieren.

[0012] Die Erfinder haben festgestellt, daß Immunglobuline eine andere Struktur als das bekannte Vier-Ketten-Modell aufweisen können und daß solche anderen Immunglobuline neue Mittel zur Herstellung von Diagnosereagenzien, Heilmitteln oder irgendwelchen anderen Reagenzien zur Verwendung in der Forschung oder für industrielle Zwecke bieten.

[0013] Somit stellt die Erfindung neue Immunglobuline zur Verfügung, welche in der Lage sind, funktionale Eigenschaften von Immunglobulinen nach dem Vier-Ketten-Modell zu zeigen, obwohl ihre Struktur in vielen Fällen für ihre Anwendung, ihre Herstellung und in manchen Fällen für ihre Modifikation besser geeignet zu sein scheint. Darüberhinaus können diese Moleküle als Leitstrukturen zur Modifikation anderer Immunglobuline betrachtet werden. Die Vorteile, welche durch diese Immunglobuline zur Verfügung gestellt werden, umfassen die Möglichkeit, diese mit einer erhöhten Leichtigkeit herzustellen.

[0014] Die Erfindung betrifft ein Immunglobulin, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es von Kamelartigen erhältlich ist und daß es zwei schwere Polypeptidketten umfaßt, welche für die Bildung einer vollständigen Antigenbindungsstelle oder mehrerer Antigenbindungsstellen ausreichen, wobei den schweren Polypeptidketten eine sogenannte erste Domäne in ihrem konstanten Bereich (CH1) fehlt, wobei diesem Immunglobulin die leichten Polypeptidketten fehlen. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung, sind diese Immunglobuline weiterhin durch die Tatsache gekennzeichnet, daß sie das Produkt der Expression in einer prokaryotischen oder in einer eukaryotischen Wirtszelle einer DNA oder einer cDNA mit der Sequenz eines Immunglobulins, welchem die leichten Ketten fehlen, wie diese aus Lymphozyten oder anderen Zellen von Kamelartigen erhältlich sind, sind.

[0015] Die Immunglobuline der Erfindung können z. B. aus den Sequenzen erhalten werden, welche in **Fig. 7** beschrieben sind.

[0016] Die Immunglobuline der Erfindung, welchen die leichten Ketten fehlen, sind derart, daß die variablen Domänen ihrer schweren Ketten Eigenschaften aufweisen, die von jenen der V_H des Vier-Ketten-Immunglobulins verschieden sind. Die variable Domäne eines Immunglobulins aus schweren Ketten der Erfindung weist keine normalen Wechselwirkungsstellen mit der V_L - oder mit der C_H1 -Domäne auf, welche in den Immunglobulinen aus schweren Ketten nicht existieren. Es ist somit ein neues Fragment im Hinblick auf viele seiner Eigenschaften wie z. B. die Löslichkeit und die Lage der Bindungsstelle. Aus Gründen der Klarheit werden wir diese in diesem Text V_{HH} nennen, um sie von der klassischen V_H der Immunglobuline mit vier Ketten zu unterscheiden.

[0017] Mit "einer vollständigen Antigenbindungsstelle" ist gemäß der Erfindung eine Stelle gemeint, welche allein die Erkennung und vollständige Bindung eines Antigens ermöglicht. Dieses könnte durch irgendein bekanntes Verfahren in Bezug auf das Testen der Bindungsaffinität verifiziert werden.

[0018] Diese Immunglobuline, welche durch die rekombinante DNA-Technik hergestellt werden können oder aus Tieren isoliert werden können, werden manchmal auf den folgenden Seiten "Immunglobuline aus schweren Ketten" genannt. Vorzugsweise liegen diese Immunglobuline in einer reinen Form vor.

[0019] Die Immunglobuline sind in prokaryotischen Zellen, insbesondere in E. coli-Zellen, durch ein Verfahren erhältlich, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Klonieren in einen Bluescript-Vektor einer DNA- oder cDNA-Sequenz, welche für die V_{HH} -Domäne eines Immunglobulins codiert, dem die leichte Kette fehlt, welche beispielsweise aus Lymphozyten von Kamelartigen erhältlich ist,
- b) Gewinnen des klonierten Fragments nach Amplifizierung unter Verwendung eines 5'-Primers, der eine Xho-Stelle enthält, und eines 3'-Primers, welcher die Spe-Stelle mit der folgenden Sequenz

TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG,

enthält,

c) Klonieren des gewonnenen Fragments in gleicher Phase in den Immun-PBS-Vektor nach Verdau des Vektors mit Xho- und Spe-Restriktionsenzymen,

d) Transformieren von Wirtszellen, insbesondere E. coli, durch Transfektion mit dem rekombinanten Im-

mun-PBS-Vektor aus Schritt c,

e) Gewinnen des Expressionsprodukts der V_{HH} -Codierungssequenz, z. B. indem Antikörper verwendet werden, die gegen die V_{HH} -Domäne eines Dromedars hervorgerufen wurden.

[0020] Die Immunglobuline können heterospezifische Immunglobuline sein, welche durch ein Verfahren erhältlich sind, das die folgenden Schritte umfaßt:

- Erhalten einer ersten DNA- oder cDNA-Sequenz, die für eine V_{HH} -Domäne oder einen Teil davon mit einer determinierten Spezifität gegenüber einem vorgegebenen Antigen codiert und zwischen Xho- und Spe-Stellen liegt,
- Erhalten einer zweiten DNA- oder cDNA-Sequenz, die für eine V_{HH} -Domäne oder einen Teil davon codiert, welche eine determinierte Spezifität aufweist, die von der Spezifität der ersten DNA- oder cDNA-Sequenz verschieden ist, und welche zwischen den Spe- und EcoRI-Stellen liegt,
- Verdauen eines Immun-PBS-Vektors mit EcoRI- und XhoI-Restriktionsenzymen,
- Ligieren der erhaltenen DNA- oder cDNA-Sequenzen, welche für die V_{HH} -Domänen codieren, so daß die DNA- oder cDNA-Sequenzen in Folge in den Vektor kloniert werden,
- Transformieren einer Wirtszelle, insbesondere einer E. coli-Zelle, durch Transfektion und Gewinnen der erhaltenen Immunglobuline.

[0021] In einer Ausführungsform sind die Immunglobuline durch ein Verfahren erhältlich, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- Erhalten einer DNA- oder cDNA-Sequenz, die für eine V_{HH} -Domäne oder einen Teil davon codiert, welche eine determinierte spezifische Antigenbindungsstelle aufweist,
- Amplifizieren der erhaltenen DNA oder cDNA, wobei ein 5'-Primer, der ein Startcodon und eine HindII-Stelle enthält, und ein 3'-Primer, welcher ein Stoppcodon mit einer XhoI-Stelle enthält, verwendet werden,
- Rekombinieren der amplifizierten DNA oder cDNA in die HindIII-(Position 2650)- und XhoI-(Position 4067)-Stellen eines Plasmids pMM984,
- Transfizieren permissiver Zellen, insbesondere NB-E-Zellen, mit dem rekombinanten Plasmid,
- Gewinnen der erhaltenen Produkte.

[0022] Eine erfolgreiche Expression kann mit Antikörpern, die gegen einen Bereich einer V_{HH} -Domäne gerichtet sind, insbesondere durch einen ELISATest verifiziert werden.

[0023] Gemäß einer anderen besonderen Ausführungsform dieses Verfahrens werden die Immunglobuline in ein Parvovirus kloniert.

[0024] In einem anderen Beispiel sind diese Immunglobuline durch ein Verfahren erhältlich, welches die weitere Klonierung einer zweiten DNA- oder cDNA-Sequenz mit einer anderen determinierten Antigenbindungsstelle in das pMM984-Plasmid umfaßt.

[0025] Ein solches Immunglobulin kann weiter dadurch gekennzeichnet werden, daß es durch ein Verfahren erhältlich ist, in welchem der Vektor Yep 52 ist und die transformierte rekombinante Zelle eine Hefe, insbesondere *S. cerevisiae* ist.

[0026] Ein besonderes Immunglobulin ist dadurch gekennzeichnet, daß es eine katalytische Aktivität aufweist, insbesondere dadurch, daß es gegen ein Antigen gerichtet ist, welches einen aktivierten Zustand eines gegebenen Substrats nachahmt. Diese katalytischen Antikörper können in dem Bereich ihrer Bindungsstelle durch zufällige oder gerichtete Mutagenese modifiziert werden, um ihre katalytische Funktion zu steigern oder zu modifizieren. Für die allgemeine Technik zur Herstellung solcher katalytischen Immunglobuline kann auf die Veröffentlichung von Lerner et al. (TIBS, November 1987, 427–430) Bezug genommen werden.

[0027] Gemäß einem bevorzugten Beispiel sind die Immunglobuline dadurch gekennzeichnet, daß ihre variablen Bereiche an Position 45 eine Aminosäure enthalten, welche von einem Leucin-, Prolin- oder Glutaminrest verschieden ist.

[0028] Darüberhinaus sind die Immunglobuline aus schweren Ketten keine Produkte, die für Lymphozyten von Tieren oder für Lymphozyten eines menschlichen Patienten, die an Lymphopathien leiden, charakteristisch sind. Solche Immunglobuline, die bei Lymphopathien produziert werden, sind vom Ursprung her monoklonal und resultieren aus pathogenen Mutationen auf dem Niveau des Genoms. Sie haben anscheinend keine Antigenbindungsstelle.

- [0029]** Die zwei schweren Polypeptidketten dieser Immunglobuline können durch eine Gelenkregion gemäß der Definition von Roitt et al. verknüpft sein.
- [0030]** In einem besonderen Beispiel sind Immunglobuline, welche den oben definierten Molekülen entsprechen, in der Lage, als Antikörper zu wirken.
- [0031]** Die Antigenbindungsstelle(n) der Immunglobuline der Erfindung sind in dem variablen Bereich der schweren Kette lokalisiert.
- [0032]** Bei einer bestimmten Gruppe dieser Immunglobuline enthält jede schwere Polypeptidkette eine Antigenbindungsstelle in ihrem variablen Bereich, und diese Stellen entsprechen derselben Aminosäuresequenz.
- [0033]** In einem weiteren Beispiel sind die Immunglobuline dadurch gekennzeichnet, daß ihre schweren Polypeptidketten einen variablen Bereich (V_{HH}) und einen konstanten Bereich (C_H) gemäß der Definition von Roitt et al. enthalten, ihnen aber die erste Domäne ihres konstanten Bereichs fehlt. Diese erste Domäne des konstanten Bereichs wird C_{H1} genannt.
- [0034]** Diese Immunglobuline, welche keine C_{H1} -Domäne aufweisen, sind derart, daß der variable Bereich ihrer Ketten an dem C-terminalen Teil des variablen Bereichs direkt mit der Gelenkregion verknüpft ist.
- [0035]** Die Immunglobuline des vorstehend beschriebenen Typs können Immunglobuline vom Typ G und insbesondere Immunglobuline, welche als Immunglobuline der Klasse 2 (IgG2) oder Immunglobuline der Klasse 3 (IgG3) definiert werden, umfassen.
- [0036]** Das Fehlen der leichten Kette und der ersten konstanten Domäne führt zu einer Modifikation der Nomenklatur gemäß Roitt et al. der Immunglobulinfragmente, welche durch enzymatischen Verdau erhalten werden.
- [0037]** Die Begriffe Fc und pFc einerseits, Fc' und pFc' andererseits, welche den Papain- bzw. den Pepsin-verdaufragmenten entsprechen, werden beibehalten.
- [0038]** Die Begriffe Fab, F(ab)₂, F(ab')₂, Fabc, Fd und Fv sind nicht länger in ihrem ursprünglichen Sinn anwendbar, da diese Fragmente entweder eine leichte Kette, den variablen Teil der leichten Kette oder die C_{H1} -Domäne aufweisen.
- [0039]** Die Fragmente, welche durch Papainverdau erhalten werden und aus der V_{HH} -Domäne und der Gelenkregion zusammengesetzt sind, werden FV_{HH}h oder F(V_{HH}h)₂ genannt, was davon abhängt, ob diese durch die Disulfidbindungen verknüpft bleiben oder nicht.
- [0040]** Immunglobuline, welche den vorstehend angegebenen Definitionen entsprechen, können aus Tieren, insbesondere aus Tieren der Familie der Kamelartigen stammen. Die Erfinder haben herausgefunden, daß die Immunglobuline aus schweren Ketten, welche in den Kamelartigen vorliegen, nicht mit einem pathologischen Zustand verbunden sind, welcher die Produktion abnormer Antikörper in Bezug auf die Immunglobuline mit vier Ketten induzieren würde. Auf der Grundlage einer vergleichenden Untersuchung der Kamelartigen der alten Welt (Camelus bactrianus und Camelus dromaderius) und der Kamelartigen der neuen Welt (z. B. Lama Paccos, Lama Glama und Lama Vicugna) haben die Erfinder gezeigt, daß die Immunglobuline der Erfindung, welchen leichte Polypeptidketten fehlen, bei allen Spezies gefunden werden. Nichtsdestotrotz können Unterschiede bei dem Molekulargewicht dieser Immunglobuline in Abhängigkeit von den Tieren auftreten. Insbesondere kann das Molekulargewicht einer schweren Kette, welche in diesen Immunglobulinen enthalten ist, von ungefähr 43 kD bis ungefähr 47 kD reichen und insbesondere 45 kD betragen.
- [0041]** Die Immunglobuline aus schweren Ketten der Erfindung werden vorteilhafterweise in das Blut der Kamelartigen sezerniert.
- [0042]** Immunglobuline gemäß diesem besonderen Beispiel sind durch Reinigung aus dem Serum von Kamelartigen erhältlich, und ein Verfahren zur Reinigung wird im Detail in den Beispielen beschrieben. In dem Fall, wo die Immunglobuline aus Kamelartigen erhalten werden, liegen die Immunglobuline nicht in ihrer natürlichen biologischen Umgebung vor.
- [0043]** Das Immunglobulin IgG2, wie es durch Reinigung aus dem Serum von Kamelartigen erhältlich ist,

kann so charakterisiert werden, daß es:

- nicht durch Chromatographie auf einer Protein-G-Sepharosesäule adsorbiert wird,
- durch Chromatographie auf einer Protein-A-Sepharosesäule adsorbiert wird,
- ein Molekulargewicht von ca. 100 kD nach Elution mit einem Puffer mit pH 4,5 (0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure, eingestellt auf pH 4,5 mit NaOH) aufweist,
- aus schweren γ 3-Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von ca. 46 kD, vorzugsweise 45, nach Reduktion besteht.

[0044] Eine andere Gruppe von Immunglobulinen, welche IgG3 entsprechen, wie sie durch Reinigung aus dem Serum von Kamelartigen erhältlich sind, wird so charakterisiert, daß das Immunglobulin:

- durch Chromatographie auf einer Protein-A-Sepharosesäule adsorbiert wird,
- ein Molekulargewicht um ca. 100 kD nach Elution mit einem Puffer mit pH 3,5 (0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure) aufweist,
- durch Chromatographie auf einer Protein-G-Sepharosesäule adsorbiert wird und mit einem Puffer mit pH 3,5 (0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure) eluiert wird,
- aus schweren γ 3-Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht um ca. 45 kD, insbesondere zwischen 43 und 47 kD nach Reduktion besteht.

[0045] Die Immunglobuline der Erfindung, welchen die leichten Ketten fehlen, umfassen nichtsdestotrotz auf ihren schweren Ketten einen konstanten Bereich und einen variablen Bereich. Der konstante Bereich umfaßt verschiedene Domänen.

[0046] Der variable Bereich der Immunglobuline der Erfindung umfaßt Gerüstregionen (FW) und komplementaritätsbestimmende Bereiche (CDR), insbesondere vier Gerüstregionen und drei Komplementaritätsbereiche. Er ist von den Immunglobulinen mit vier Ketten insbesondere durch die Tatsache unterschieden, daß dieser variable Bereich selbst ohne den Beitrag des variablen Bereichs einer leichten Kette, welche fehlt, eine Antigenbindungsstelle oder mehrere enthalten kann.

[0047] Die Aminosäuresequenzen der Gerüstregionen 1 und 4 umfassen unter anderem entsprechende Aminosäuresequenzen, welche aus den folgenden ausgewählt werden können:

Für die Domäne der Gerüstregion 1

```

G G S V Q T G G S L R L S C E I S G L T F D
G G S V Q T G G S L R L S C A V S G F S F S
G G S E Q G G G S L R L S C A I S G Y T Y G
G G S V Q P G G S L T L S C T V S G A T Y S
G G S V Q A G G S L R L S C T G S G F P Y S
G G S V Q A G G S L R L S C V A G F G T S
G G S V Q A G G S L R L S C V S F S P S S

```

Für die Domäne der Gerüstregion 4

```

W G Q G T Q V T V S S
W G Q G T L V T V S S
W G Q G A Q V T V S S
W G Q G T Q V T A S S
R G Q G T Q V T V S L

```

Für die CDR3-Domäne

```

A L Q P G G Y C G Y G X - - - - - C L
V S L M D R I S Q H - - - - - G C
V P A H L G P G A I L D L K K Y - - - - - K Y
F C Y S T A G D G G S G E - - - - - M Y
E L S G G S C E L P L L F - - - - - D Y
D W K Y W T C G A Q T G G Y F - - - - - G Q
R L T E M G A C D A R W A T L A T R T F A Y N Y
Q K K D R T R W A E P R E W - - - - - M N
G S R F S S P V G S T S R L E S - S D Y - - N Y
A D P S I Y Y S I L X I E Y - - - - - K Y
D S P C Y M P T M P A P P I R D S F G W - - D D
T S S F Y W Y C T T A P Y - - - - - N V
T E I E W Y G C N L R T T F - - - - - T R
N Q L A G G W Y L D P N Y W L S V G A Y - - A I
R L T E M C A C D A R W A T L A T R T F A Y N Y
D G W T R K E G G I G L P W S V Q C E D G Y N Y
D S Y P C H L L - - - - - D V
V E Y P I A D M C S - - - - - R Y

```

[0048] Wie oben angegeben ist, fehlt den Immunglobulinen der Erfindung vorzugsweise ihre gesamte C_H1-Domäne.

[0049] Solche Immunglobuline umfassen C_H2- und C_H3-Domänen in dem in Bezug auf die Gelenkregion C-terminalen Bereich.

[0050] Der konstante Bereich umfaßt der Immunglobuline C_H2- und C_H3-Domänen, welche eine Aminosäuresequenz umfassen, die ausgewählt ist aus den folgenden:
für die C_H2-Domäne:

```

APELLGGPTVFIFFPKPKDVLSITLTP
APELLGGPSVVFVPTKPKDVLSISGRP
APELLGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRP
APELLGGPSVFIFFPKPKDVLSISGRP

```

für die C_H3-Domäne:

```

GQTRPQVYTLA
GQTRPQVYTLAPXRLEL
GQPREPQVYTLPPSRDEL
GQPREPQVYTLPPSREEM
GQPREPQVYTLPPSQEEM

```

[0051] Interessanterweise haben die Erfinder gezeigt, daß die Gelenkregion der Immunglobuline der Erfindung verschiedene Längen aufweisen kann. Wenn diese Immunglobuline als Antikörper wirken, wird die Länge der Gelenkregion an der Festlegung des Abstands teilnehmen, welcher die Antigenbindungsstellen trennt.

[0052] Vorzugsweise ist ein Immunglobulin gemäß der Erfindung dadurch gekennzeichnet, daß seine Gelenkregion von 0 bis 50 Aminosäuren umfaßt.

[0053] Besondere Sequenzen der Gelenkregion der Immunglobuline der Erfindung sind die folgenden:

GTNEVCKCPKCP

oder

EPKIPQPQPKPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP

[0054] Die kurze Gelenkregion entspricht einem IgG3-Molekül und die lange Gelenksequenz entspricht einem IgG2-Molekül.

[0055] Isolierte V_{HH} , die von Immunglobulinen aus schweren Ketten abgeleitet wurden, oder V_{HH} -Bibliotheken, welche den Immunglobulinen aus schweren Ketten entsprechen, können von klonierten V_{HH} von Immunglobulinen gemäß dem Vier-Ketten-Modell auf der Grundlage von Sequenzmerkmalen, welche die Immunglobuline aus schweren Ketten kennzeichnen, unterschieden werden.

[0056] Der V_{HH} -Bereich des Kamelimmunglobulins aus schweren Ketten zeigt eine Anzahl von Unterschieden zu den V_{HH} -Bereichen, die von den Immunglobulinen mit vier Ketten aus allen untersuchten Spezies abgeleitet wurden. In den Bereichen der Reste, welche an den V_{HH}/V_L -Wechselwirkungen beteiligt sind, wird ein wichtiger Unterschied in dem Bereich der Position 45 (FW) festgestellt, welche bei den Immunglobulinen mit vier Ketten praktisch immer Leucin ist (98%), wobei die anderen Aminosäuren an dieser Position Prolin (1%) oder Glutamin (1%) sind.

[0057] Bei dem Kamelimmunglobulin aus schweren Ketten wird bei den derzeit untersuchten Sequenzen nur einmal Leucin an Position 45 gefunden. Es könnte aus einem Immunglobulin mit vier Ketten stammen. In den anderen Fällen ist es durch einen Arginin-, Cystein- oder einen Glutaminsäurerest ersetzt. Das Vorliegen von geladenen Aminosäuren an dieser Position sollte dazu beitragen, die V_{HH} löslicher zu machen.

[0058] Der Ersatz durch für Kamelartige spezifische Reste wie z. B. jene von Position 45 scheint für die Konstruktion gentechnisch hergestellter V_{HH} -Bereiche, die von dem V_{HH} -Repertoire der Immunglobuline mit vier Ketten abgeleitet sind, interessant zu sein.

[0059] Ein zweites Merkmal, das für die V_{HH} -Domäne der Kamelartigen spezifisch ist, ist das häufige Auftreten eines Cysteins in dem CDR_3 -Bereich, welches mit einem Cystein in der CDR_1 -Position 31 oder 33 oder dem FW_2 -Bereich an der Position 45 verbunden ist. Die Möglichkeit eine Disulfidbindung zwischen dem CDR_3 -Bereich und dem Rest der variablen Domäne zu errichten, würde zur Stabilität und der Positionierung der Bindungsstelle beitragen.

[0060] Mit Ausnahme eines einzelnen pathogenen Myelomproteins (DAW) wurde eine solche Disulfidbindung nie in Immunglobulin-V-Bereichen angetroffen, die von Immunglobulinen mit vier Ketten abgeleitet waren.

[0061] Die Immunglobuline aus schweren Ketten haben weiterhin den besonderen Vorteil, daß sie nicht klebrig sind. Demgemäß aggregieren diese Immunglobuline, welche im Serum vorliegen, viel weniger als isolierte schwere Ketten eines Immunglobulins mit vier Ketten. Die Immunglobuline der Erfindung sind bis zu einer Konzentration über 0,5 mg/ml, vorzugsweise über 1 mg/ml und noch bevorzugter über 2 mg/ml löslich.

[0062] Diese Immunglobuline zeigen weiterhin ein umfassendes Antigenbindungsrepertoire und machen in vivo eine Reifung im Hinblick auf die Affinität und Spezifität durch. Dementsprechend ermöglichen sie die Isolierung und die Herstellung von Antikörpern mit definierter Spezifität, was determinierte Antigene betrifft.

[0063] Eine andere interessante Eigenschaft der Immunglobuline ist, daß diese modifiziert und insbesondere humanisiert werden können. Insbesondere ist es möglich, den gesamten oder einen Teil des konstanten Bereichs dieser Immunglobuline durch den gesamten oder einen Teil eines konstanten Bereichs eines menschlichen Antikörpers zu ersetzen. Beispielsweise könnten die C_H2 - und/oder C_H3 -Domänen des Immunglobulins durch die C_H2 - und/oder C_H3 -Domänen des menschlichen IgG- γ 3-Immunglobulins ersetzt werden.

[0064] Bei solchen humanisierten Antikörpern ist es ebenfalls möglich, einen Teil der variablen Sequenz, nämlich einen oder mehrere der Reste der Gerüstregion, welche nicht in der Bindungsstelle liegen, durch Res-

te der menschlichen Gerüstregion oder durch einen Teil eines menschlichen Antikörpers zu ersetzen.

[0065] Umgekehrt könnten Merkmale (insbesondere Peptidfragmente) der V_{HH} -Bereiche des Immunglobulins aus schweren Ketten in die V_H - oder V_L -Bereiche, welche von Immunglobulinen mit vier Ketten abgeleitet sind, beispielsweise mit dem Ziel, eine größere Löslichkeit der Immunglobuline zu erreichen, eingeführt werden.

[0066] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Fragment eines Immunglobulins, welches vorstehend beschrieben wurde, und insbesondere ein Fragment, das aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

- einem Fragment, bei dem es sich um eine schwere Polypeptidkette eines erfindungsgemäßen Immunglobulins handelt, oder einem Fragment, bei dem es sich um den variablen Bereich einer schweren Kette eines erfindungsgemäßen Immunglobulins handelt, wobei beide Fragmente einen Aminosäurerest an Position 45 der schweren Kette tragen, bei dem es sich um eine geladene Aminosäure oder einen Cysteinrest handelt, wobei das Fragment eine determinierte Antigenbindungsstelle bildet.
- Fragmenten, die durch enzymatischen Verdau der Immunglobuline der Erfindung erhalten werden, was zu dem $FV_{HH}h$ -Fragment (das die Antigenbindungsstellen der schweren Ketten enthält) oder dessen Dimer $F(V_{HH}h)_2$ führt,
- homologen Fragmenten, die mit anderen proteolytischen Enzymen erhalten werden.

[0067] Die Fragmente können durch enzymatischen Abbau der Immunglobuline erhalten werden. Sie können ebenfalls durch Expression in Zellen oder Organismen von einer Nukleotidsequenz, welche für die Immunglobuline codiert, erhalten werden oder sie können chemisch synthetisiert werden.

[0068] Die Erfindung betrifft ebenfalls anti-Idiotyp-Antikörper, welche zu den Klassen der Immunglobuline aus schweren Ketten gehören. Solche anti-Idiotypen können gegen menschliche oder tierische Idiotypen erzeugt werden. Eine Eigenschaft dieser anti-Idiotypen ist, daß diese als idiotype Impfstoffe, insbesondere zur Impfung gegen Glycoproteine oder Glycolipide, und in Fällen, wo das Kohlenhydrat den Epitop festlegt, verwendet werden können.

[0069] Die Erfindung betrifft ebenfalls anti-Idiotypen, die in der Lage sind, Idiotypen von Immunglobulinen aus schweren Ketten zu erkennen.

[0070] Solche anti-Idiotyp-Antikörper können entweder syngene Antikörper oder allogene oder xenogene Antikörper sein.

[0071] Die Erfindung betrifft ebenfalls Nukleotidsequenzen, welche für das gesamte oder einen Teil eines Proteins codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Peptidsequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus den folgenden:

GGSVQTGGSLRLSC EISGLTFD
GGSVQTGGSLRLSCAVS GFSFS
GGSEQGGGSLRLSCA ISGYTYG
GGSVQP GGSLTL SCTVSGATYS
GGSVQAGGSLRLSCTGSGFPYS
GGSVQAGGSLRLSCVAGFGTS
GGSVQAGGSLRLSCV SFS P S S

WGQGTQVTVSS
WGQGTLVTVSS
WGQGAQVTVSS
WGQGTQV T A S S
RGQGTQVTVSL

ALQP G G Y C G Y G X - - - - - C L
VSLMDRISQH - - - - - G C
VPAHLGPGAILDLKKY - - - - - K Y
FCYSTAGDGGSGE - - - - - M Y
ELSGGSCELP L L F - - - - - D Y
DWKYWTCGAQTGGYF - - - - - G Q
RLTEMGACDARWATLATRTFAYNY
QKKDRTRWAEPREW - - - - - N N
GSRFSSPVGSTSRLES - S D Y - - N Y
ADPSIYY S I L X I E Y - - - - - K Y
DSPCYMPTMPAPPPIRDSFGW - - D D
TSSFYWYCTTAPY - - - - - N V
TEIEWYGCNLR T T F - - - - - T R
NQLAGGWYLDPNYWLSVGA Y - - A I
RLTEMGACDARWATLATRTFAYNY
DGWTRKEGGIGLPWSVQCE D G Y N Y
DSYPCHLL - - - - - D V
VEYPIADMCS - - - - - R Y

APELLGGPSVVFVFPKPKDVLSISGXPK

APELPGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRPK

APELPGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRPK

APELLGGPSVFIFPPKPKDVLSISGRPK

GQPREPQVYTLAPXRLEL

GQPREPQVYTLPPSRDEL

GQPREPQVYTLPPSREEM

GQPREPQVYTLPPSQEEM

VTVSSGTNEVCKCPKCPAPELPGGPSVVFVFP

oder

VTVSSEPKIPQPQPKPQPQPKPQPKPEPECTCPKCPAPELGGPSVVFIFP

GTNEVCKCPKCP

APELPGGPSVVFVFP

EPKIPQPQPKPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP

APELLGGPSVVFIFP

[0072] Solche Nukleotidsequenzen können von den Aminosäuresequenzen abgeleitet werden, wobei man die Degeneriertheit des genetischen Codes berücksichtigt. Sie können synthetisiert werden oder aus Zellen isoliert werden, welche die Immunglobuline der Erfindung produzieren.

[0073] Ein Verfahren zum Erhalten solcher DNA-Sequenzen wird in den Beispielen beschrieben.

[0074] Die Erfindung umfaßt ebenfalls RNA-, insbesondere mRNA-Sequenzen, welche diesen DNA-Sequenzen entsprechen, und ebenfalls entsprechende cDNA-Sequenzen.

[0075] Die Nukleotidsequenzen der Erfindung können weiterhin zur Herstellung von Primern verwendet werden, welche für den Nachweis in Zellen oder das Screenen von DNA- oder cDNA-Bibliotheken geeignet sind, um Nukleotidsequenzen zu isolieren, welche für Immunglobuline der Erfindung codieren.

[0076] Solche Nukleotidsequenzen können zur Herstellung rekombinanter Vektoren und der Expression dieser Sequenzen, die in den Vektoren enthalten sind, durch Wirtszellen, insbesondere prokaryotische Zellen wie Bakterien oder ebenso eukaryotische Zellen und z. B. CHO-Zellen, Insektenzellen, Affenzellen wie Verozellen, oder irgendwelche anderen Säugetierzellen verwendet werden. Insbesondere die Tatsache, daß den Immunglobulinen der Erfindung die leichten Ketten fehlen, erlaubt, diese in eukaryotischen Zellen zu sezernieren, da keine Notwendigkeit besteht, auf den Schritt, welcher aus der Bildung des BIP-Proteins besteht, welches bei den Immunglobulinen mit vier Ketten benötigt wird, zurückzugreifen.

[0077] Die Unzulänglichkeiten der bekannten Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper oder Immunglobuline durch rekombinante DNA-Technologie resultieren aus der Notwendigkeit, in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle gleichzeitig die V_H - und V_L -Domänen zu klonieren, welche der spezifischen Bindungsstelle der Immunglobuline mit vier Ketten entsprechen. Die Tiere und insbesondere die Kamelartigen, welche Immunglobuline aus schweren Ketten gemäß der Erfindung produzieren, und möglicherweise andere Wirbeltierarten sind in der Lage, Immunglobuline aus schweren Ketten zu produzieren, bei welchen die Bindungsstelle ausschließlich in der V_{HH} -Domäne lokalisiert ist. Anders als die wenigen Immunglobuline aus schweren Ketten, die in anderen Spezies durch Trennung der Ketten oder durch direkte Klonierung erzeugt werden, haben die Immunglobuline aus schweren Ketten der Kamelartigen eine intensive Reifung in vivo durchgemacht. Darüber hinaus hat sich ihr V-Bereich natürlich entwickelt, so daß er in Abwesenheit der V_L funktioniert. Diese sind daher ideal zur Produktion monoklonaler Antikörper durch rekombinante DNA-Technologie. Da der Erhalt der ein spezifisches Antigen bindenden Klone nicht von einem stochastischen Verfahren abhängt, das eine sehr große Anzahl rekombinanter Zellen benötigt, erlaubt dieses ebenfalls eine sehr viel eingehendere Untersuchung des Repertoires.

[0078] Dieses kann auf der Ebene des nicht umgeordneten V_{HH} -Repertoires unter Verwendung von DNA, die von einem willkürlich ausgewählten Gewebe oder Zelltyp stammt, oder auf der Ebene des umgeordneten VHH-Repertoires unter Verwendung von DNA, die aus B-Lymphozyten erhalten wurde, durchgeführt werden. Interessanter ist es jedoch, die mRNA von Antikörper-produzierenden Zellen zu transkribieren und die cDNA mit oder ohne vorherige Amplifikation in einen geeigneten Vektor zu klonieren. Dieses führt zu dem Erhalt von Antikörpern, welche schon eine Affinitätsreifung durchlaufen haben.

[0079] Die Untersuchung eines großen Repertoires sollte sich bei der Suche nach Antikörpern mit katalytischen Aktivitäten als besonders nützlich erweisen.

[0080] Die Erfindung stellt somit Bibliotheken zur Verfügung, welche auf eine Weise erzeugt werden können, die einen Teil der Gelenksequenz einschließt, wobei die Identifizierung einfach ist, da das Gelenk direkt an der V_{HH} -Domäne befestigt ist.

[0081] Diese Bibliotheken können erhalten werden, indem cDNA aus lymphoiden Zellen mit oder ohne eine vorherige PCR-Amplifikation kloniert wird. Die PCR-Primer sind in den Promoter-, Leit- oder Gerüstregionsequenzen der V. für den St-Primer und in der Gelenk-, CH_2 -, CH_3 -, der nichttranslatierten 3'-Region oder einem PolyA-Schwanz für den 3'-Primer lokalisiert. Eine Größenauswahl des amplifizierten Materials ermöglicht die Konstruktion einer Bibliothek, welche auf Immunglobuline aus schweren Ketten beschränkt ist.

[0082] In einem bestimmten Beispiel wird der folgende 3'-Primer, in welchen eine KpnI-Stelle eingebaut wurde und welcher den Aminosäuren 313 bis 319 entspricht (CGC CAT CAA GGT AAC AGT TGA), in Verbindung mit Maus- V_{HH} -Primern verwendet, welche von Sestry et al. beschrieben werden und eine Xho-Stelle enthalten.

AG GTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG CTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG GTC CAG CTT CTC GAG TCT GG

XhoI -Stelle

[0083] Diese Primer ergeben eine Bibliothek von Immunglobulinen aus schweren Ketten von Kamelartigen, welche den V_{HH} -Bereich (der mit der Untergruppe III der Maus oder des Menschen im Zusammenhang steht), das Gelenk und einen Abschnitt von CH_2 umfassen.

[0084] In einem anderen Beispiel ist die cDNA an ihrem 5'-Ende polyadenyliert, und die Maus-spezifischen V_{HH} -Primer sind in dem Bereich des Nukleotids 12 durch einen poly-T-Primer mit einer eingebauten XhoI-Stelle ersetzt.

CTCGAGT₁₂

[0085] Es wird derselbe 3'-Primer mit einer KpnI-Stelle verwendet.

[0086] Dieses Verfahren erzeugt eine Bibliothek, welche alle Untergruppen von Immunglobulinen enthält.

[0087] Ein Teil des Interesses beim Klonieren eines Bereichs, welcher die Gelenk- CH_2 -Verknüpfung umfaßt, liegt darin, daß sowohl bei γ_2 als auch γ_3 eine Sac-Stelle unmittelbar nach dem Gelenk vorliegt. Diese Stelle ermöglicht das Pfropfen der Sequenz, welche für die V_{HH} und das Gelenk codiert, auf den Fc-Bereich anderer Immunglobuline, insbesondere des menschlichen IgG₁ und IgG₃ welche an dieser Stelle dieselbe Aminosäuresequenz aufweisen (Glu₂₄₆ Leu₂₄₇).

[0088] Als ein Beispiel befaßt sich die Erfindung mit einer cDNA-Bibliothek, welche aus Nukleotidsequenzen zusammengesetzt ist, die für ein Immunglobulin aus schweren Ketten codieren, wie sie beispielsweise durch ein Durchführen der folgenden Schritte erhalten wird:

- a) Behandeln einer Probe, die lymphoide Zellen, insbesondere periphere Lymphozyten, Milzzellen, Lymphknoten oder ein anderes Lymphgewebe aus einem gesunden Tier, das insbesondere ausgewählt wird aus den Kamelartigen, enthält, um die lymphoiden Zellen abzutrennen,
- b) Abtrennen polyadenylierter RNA von den anderen Nukleinsäuren und Bestandteilen der Zellen,
- c) Umsetzen der erhaltenen RNA mit einer reversen Transkriptase, um die entsprechende cDNA zu erhalten,
- d) Inkontaktbringen der cDNA aus Schritt c) mit 5'-Primern, welche der V_H -Domäne von Immunglobulinen

mit 4 Ketten aus Mäusen entsprechen, wobei der Primer eine festgelegte Restriktionsstelle, z. B. eine XhoI-Stelle enthält, und mit 3'-Primern, welche dem N-terminalen Teil einer C_H2-Domäne entsprechen, welche eine KpnI-Stelle enthalten,

e) Amplifizieren der DNA,

f) Klonieren der amplifizierten Sequenz in einen Vektor, insbesondere in einen Bluescript-Vektor,

g) Gewinnen der Klone, die mit einer Sonde hybridisieren, welche der Sequenz entspricht, die für eine konstante Domäne aus einem isolierten Immunglobulin aus schweren Ketten codiert.

[0089] Diese Klonierung ruft Klone hervor, welche DNA-Sequenzen enthalten, die die Sequenz, die für das Gelenk codiert, einschließen. Sie erlaubt somit die Charakterisierung der Unterklasse des Immunglobulins und der SacI-Stelle, welche zum Pfropfen des FVE_{HH}-h- auf den Fc-Bereich nützlich ist.

[0090] Die Gewinnung der Sequenzen, welche für die Immunglobuline aus schweren Ketten codieren, kann ebenfalls durch die Auswahl von Klonen erreicht werden, welche DNA-Sequenzen enthalten, die eine Größe aufweisen, die mit dem Fehlen der C_H1-Domäne vereinbar ist.

[0091] Es ist gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung möglich, die folgenden Schritte zwischen den Schritten c) und d) des obigen Verfahrens hinzuzufügen:

- In Gegenwart einer DNA-Polymerase und von Deoxyribonukleotidtriphosphaten Inkontaktbringen der cDNA mit degenerierten Oligonukleotid-Primern, deren Sequenzen in der Lage sind, für die Gelenkregion und die N-terminale V_{HH}-Domäne eines Immunglobulins zu codieren, wobei die Primer in der Lage sind, an die cDNA zu hybridisieren und in der Lage sind, die Verlängerung einer DNA-Sequenz zu initiieren, die zu der cDNA, welche als Matrize verwendet wird, komplementär ist,
- Gewinnen der amplifizierten DNA.

[0092] Die Klone können in mehreren Typen von Expressionsvektoren exprimiert werden. Als ein Beispiel werden unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Vektors Immun-PBS (Huse et al., Science (1989) 246, 1275) Klone, die in Bluescript[®] gemäß dem oben beschriebenen Verfahren erzeugt wurden, durch PCR gewonnen, wobei derselbe XhoI-haltige 5'-Primer und ein neuer 3'-Primer verwendet werden, welcher den Resten 113–103 in der Gerüstregion der Immunglobuline entspricht, in welchen eine Spe-Stelle eingebaut wurde: TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG.

[0093] Dieses Verfahren ermöglicht die Klonierung der V_{HH} in die Xho/SpeStelle des Immun-PBS-Vektors. Jedoch befindet sich das 3'-Ende des Gens nicht in der gleichen Phase mit dem Identifikations-"Tag" und dem Stopcodon des Vektors. Um dieses zu erreichen, wird das Konstrukt mit Spe geschnitten und die Überhänge von vier Basen werden aufgefüllt, wobei das Klenow-Fragment verwendet wird, wonach der Vektor erneut ligiert wird. Eine weitere Verfeinerung besteht in dem Ersetzen des Markers ("tag") durch ein Polyhistidin, so daß eine Reinigung der klonierten V_{HH} mit Hilfe eines Metalls durchgeführt werden kann. Um dieses zu erreichen, werden zuerst ein doppelsträngiges Spe/EcoRI-Oligonukleotid, das für sechs Histidine codiert, und ein Stopcodon durch Synthese beider Stränge konstruiert, worauf ein Erwärmen und Reassoziierenlassen folgt:

```
CTA GTG CAC CAC CAT CAC CAT CAC TAA' TAG'
      AC GTG GTG GTA GTG GTA GTG ATT ATC TTA A
```

[0094] Der Vektor, welcher das Insert enthält, wird dann mit SpeI und EcoRI verdaut, um die enthaltene "tag"-Sequenz zu entfernen, welche durch die poly-His/Terminationsequenz ersetzt werden kann. Die erzeugte V_{HH} kann gleichermaßen nachgewiesen werden, indem Antikörper verwendet werden, die gegen die V_{HH}-Bereiche des Dromedars hervorgerufen wurden. Unter Laborbedingungen werden die V_{HH}-Bereiche in dem Immun-PBS-Vektor in Mengen von mg pro Liter produziert.

[0095] Die Erfindung betrifft ebenfalls eine DNA-Bibliothek, welche aus Nukleotidsequenzen zusammengesetzt ist, die für ein Immunglobulin aus schweren Ketten codieren, wie es beispielsweise aus Zellen mit umgeordneten Immunglobulingenen erhalten wird.

[0096] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Bibliothek aus Zellen von einem Tier hergestellt, das vorher gegen ein determiniertes Antigen immunisiert wurde. Dieses ermöglicht die Auswahl von Antikörpern, welche eine vorausgewählte Spezifität für das Antigen, das zur Immunisierung verwendet wurde, aufweisen.

[0097] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die Amplifikation der cDNA nicht vor dem Klo-

nieren der cDNA durchgeführt.

[0098] Die schwere Kette der Immunglobuline aus vier Ketten bleibt in der Zelle durch ein Chaperon-Protein (BIP) abgeschirmt, bis diese mit einer leichten Ketten kombiniert wird. Die Bindungsstelle für das Chaperon-Protein ist die C_H1-Domäne. Da diese Domäne den Immunglobulinen aus schweren Ketten fehlt, ist deren Sekretion von dem Vorliegen des BIP-Proteins oder der leichten Kette unabhängig. Darüberhinaus haben die Erfinder gezeigt, daß die erhaltenen Immunglobuline nicht klebrig sind und dementsprechend nicht anomal aggregieren werden.

[0099] Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers, welcher gegen ein determiniertes Antigen gerichtet ist, wobei die Antigenbindungsstelle des Antikörpers aus schweren Polypeptidketten besteht und wobei dem Antikörper weiterhin die leichten Polypeptidketten fehlen, wobei das Verfahren umfaßt:

- Immortalisieren von Lymphozyten, die beispielsweise aus dem peripheren Blut von Kamelartigen, die vorher mit einem determinierten Antigen immunisiert wurden, erhalten wurden, mit einer unsterblichen Zelle und vorzugsweise mit Myelomzellen, um ein Hybridom zu bilden,
- Kultivieren der gebildeten immortalisierten Zellen (Hybridom) und Gewinnen der Zellen, welche die Antikörper mit der gewünschten Spezifität produzieren.

[0100] Die Herstellung der Antikörper kann ebenfalls ohne eine vorherige Immunisierung der Kamelartigen durchgeführt werden.

[0101] Gemäß einem anderen Verfahren zur Herstellung von Antikörpern ist ein Rückgriff auf die Technik der Hybridomzellen nicht erforderlich.

[0102] Gemäß einem solchen Verfahren werden Antikörper in vitro hergestellt, und diese können durch ein Verfahren erhalten werden, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- Klonieren in Vektoren, insbesondere in Phagen und besonders bevorzugt filamentösen Bakteriophagen, von DNA- oder cDNA-Sequenzen, die aus Lymphozyten, insbesondere PBLs von Kamelartigen erhalten wurden, die vorher mit determinierten Antigenen immunisiert wurden,
- Transformieren von prokaryotischen Zellen mit den obigen Vektoren unter Bedingungen, welche die Produktion der Antikörper erlauben,
- Selektieren der Antikörper im Hinblick auf ihre Struktur aus schweren Ketten und weiterhin Unterwerfen dieser unter eine Antigen-Affinitätsselektion,
- Gewinnen der Antikörper mit der gewünschten Spezifität.

[0103] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird das Klonieren in Vektoren, insbesondere in Plasmide, welche für bakterielle Membranproteine codieren, durchgeführt. Prokaryotische Zellen werden dann mit den obigen Vektoren unter Bedingungen transformiert, welche die Expression von Antikörpern in deren Membran erlauben.

[0104] Die positiven Zellen werden weiter durch Antigenaffinitätsselektion selektioniert.

[0105] Die Antikörper aus schweren Ketten, welche die C_H1-Domäne nicht enthalten, weisen in dieser Hinsicht einen deutlichen Vorteil auf. Tatsächlich bindet die C_H1-Domäne an Chaperon-Proteine vom Typ BIP, welche innerhalb eukaryotischer Vektoren vorliegen, und die schweren Ketten werden nicht aus dem endozytoplasmatischen Retikulum heraustransportiert, wenn nicht leichte Ketten vorliegen. Dieses bedeutet, daß in eukaryotischen Zellen eine effiziente Klonierung von Immunglobulinen mit vier Ketten in Nicht-Säugetierzellen wie z. B. Hefezellen von den Eigenschaften des vorhandenen Chaperones vom Typ BIP abhängen kann und somit sehr schwer zu erreichen sein kann. In dieser Hinsicht weisen die Antikörper aus schweren Ketten der Erfindung, welchen die C_H1-Domäne fehlt, einen deutlichen Vorteil auf.

[0106] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann das Klonieren in Hefe entweder zur Produktion von Antikörpern oder zur Modifikation des Metabolismus der Hefe durchgeführt werden. Beispielsweise kann der Yep-52-Vektor verwendet werden. Dieser Vektor weist den Replikationsursprung (ORI) 2 µ aus der Hefe zusammen mit einem Selektionsmarker Leu 2 auf.

[0107] Das klonierte Gen befindet sich unter der Kontrolle des gall-Promotors und ist dementsprechend durch Galactose induzierbar. Darüberhinaus kann die Expression durch Glucose reprimiert werden, was den Erhalt einer sehr hohen Konzentration von Zellen vor der Induktion erlaubt.

[0108] Die Klonierung zwischen die BamHI- und Sall-Stellen unter Verwendung derselben Strategie zur Produktion der Gene durch PCR wie die oben beschriebene ermöglicht die Klonierung von Immunglobulinen der Kamelartigen in *E. coli*. Als ein Beispiel für die Modulation des Stoffwechsels, welche durch Antikörper erhalten werden kann und für die Hefe vorgeschlagen wurde, kann man die Klonierung von Antikörpern, welche gegen Cycline, d. h. Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus der Hefe beteiligt sind, gerichtet sind, zitieren (TIBS 16 430 J. D. McKinney, N. Heintz 1991). Ein anderes Beispiel ist die Einführung durch Gentechnologie eines Antikörpers, der gegen CD₂₈ gerichtet ist, in das Genom der Hefe, wobei der Antikörper induzierbar wäre (z. B. durch Galt.). Die CD₂₈ ist in den Bereich der Initiierung der Zellteilung involviert, und daher würde die Expression von Antikörpern gegen dieses Molekül eine effiziente Kontrolle der Multiplikation der Zellen und die Optimierung von Verfahren zur Produktion in Bioreaktoren oder mittels immobilisierter Zellen erlauben.

[0109] In noch einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist der Klonierungsvektor ein Plasmid oder ein eukaryotischer Virusvektor, und die Zellen, welche transformiert werden sollen, sind eukaryotische Zellen, insbesondere Hefezellen, Säugetierzellen, z. B. CHO-Zellen, oder Affenzellen wie z. B. Vero-Zellen, Insektenzellen, Pflanzenzellen oder Protozoenzellen.

[0110] Für mehr Details, welche das Verfahren betreffen, das in einem solchen Fall angewendet wird, wird auf die Veröffentlichung von Marks et al., *J. Mol. Biol.* 1991, 222: 581–597 Bezug genommen.

[0111] Weiterhin können ausgehend von den Immunglobulinen oder von deren Fragmenten neue Immunglobuline oder Derivate hergestellt werden.

[0112] Demgemäß können Immunglobuline, welche den oben angegebenen Definitionen entsprechen, gegen determinierte Antigene hergestellt werden. Insbesondere stellt die Erfindung monoklonale oder polyklonale Antikörper zur Verfügung, welchen die leichten Polypeptidketten fehlen, oder Antiseren, welche solche Antikörper enthalten und welche gegen determinierte Antigene und beispielsweise gegen Antigene von pathologischen Agenzien wie z. B. Bakterien, Viren und Parasiten gerichtet sind. Als ein Beispiel für Antigene oder antigene Determinanten, gegen welche Antikörper hergestellt werden könnten, kann man die Hüllglycoproteine von Viren oder deren Peptide wie beispielsweise das äußere Hüllglycoprotein eines HIV-Virus, das Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus zitieren.

[0113] Immunglobuline können ebenfalls gegen ein Protein, Hapten, Kohlenhydrat oder eine Nukleinsäure gerichtet sein.

[0114] Besondere Antikörper gemäß der Erfindung sind gegen den Galactosyl- α -1-3-Galactoseepitop gerichtet.

[0115] Die Immunglobuline erlauben weiterhin die Herstellung von kombinierten Produkten wie beispielsweise der Kombination des Immunglobulins aus schweren Ketten oder eines Fragments davon mit einem Toxin, einem Enzym, einem Arzneimittel, einem Hormon.

[0116] Als Beispiel kann man die Kombination aus einem Immunglobulin aus schweren Ketten, welches eine Antigenbindungsstelle trägt, die ein Myelomimmungglobulinepitop erkennt, mit dem Abrin- oder Mistlectintoxin herstellen. Ein solches Konstrukt hätte Anwendungen bei einer patientenspezifischen Therapie.

[0117] Eine andere vorteilhafte Kombination ist die, welche man aus einem Immunglobulin aus schweren Ketten, das ein Insektendarmantigen erkennt, und einem Toxin, das für Insekten spezifisch ist, wie beispielsweise die Toxine der unterschiedlichen Serotypen von *Bacillus thuringiensis* oder *Bacillus sphaericus*, herstellen kann. Ein solches Konstrukt, kloniert in Pflanzen, kann verwendet werden, um die Spezifität oder den Wirkungsbereich existierender Bakterientoxine zu vergrößern.

[0118] Die Erfindung schlägt ebenfalls Antikörper mit verschiedenen Spezifitäten auf jeder schweren Polypeptidkette vor. Diese multifunktionalen, insbesondere bifunktionalen Antikörpern konnten hergestellt werden, indem zwei schwere Ketten von Immunglobulinen der Erfindung oder eine schwere Kette eines Immunglobulins der Erfindung mit einem Fragment eines Immunglobulins nach dem Vier-Ketten-Modell kombiniert wurden.

[0119] Die Erfindung stellt ebenfalls heterospezifische Antikörper zur Verfügung, welche zum gezielten Binden an Arzneimittel oder irgendeine biologische Substanz wie Hormone verwendet werden können. Insbesondere können sie verwendet werden, um selektiv Hormone oder Cytokine gezielt an eine begrenzte Kategorie von Zellen zu binden. Beispiele sind eine Kombination aus einem Maus- oder menschlichen Antikörper, der

gegen Interleukin 2 (IL₂) hervorgerufen wurde, und einem Antikörper aus schweren Ketten, der gegen CD₄-Zellen hervorgerufen wurde. Dieser könnte verwendet werden, um CD₄-Zellen zu reaktivieren, welche ihren IL₂-Rezeptor verloren haben.

[0120] Die Immunglobuline aus schweren Ketten können ebenfalls zur Herstellung heterospezifischer Antikörper verwendet werden. Diese können entweder gemäß dem oben beschriebenen Verfahren durch Reduktion der Brücken zwischen den verschiedenen Ketten und Reoxidation gemäß den üblichen Techniken von zwei Antikörpern mit unterschiedlichen Spezifitäten erhalten werden, dieses kann aber ebenfalls durch ein Klonieren in Serie von zwei Antikörpern in beispielsweise den Immun-PBS-Vektor erreicht werden.

[0121] In einem solchen Fall wird ein erstes Gen, das der V_{HH}-Domäne entspricht, die zwischen der Xho-Stelle und einer Spe-Stelle liegt, wie oben beschrieben hergestellt. Ein zweites Gen wird dann über einen analogen Weg hergestellt, indem als das äußerste 5' Ende ein Primer mit einer Spe-Stelle und als das äußerste 3'-Ende ein Primer mit einem Stopcodon und einer EcoRI-Stelle verwendet wird, Der Vektor wird dann mit EcoRI und XhoI verdaut, und im weiteren werden beide V_{HH}-Gene entsprechend durch Xho/Spe und durch Spe/EcoRI verdaut.

[0122] Nach der Ligation werden beide Immunglobulingene in Serie kloniert. Der Abstand zwischen beiden Genen kann durch die Einführung zusätzlicher Codons innerhalb des 5'-SpeI-Primers erhöht werden.

[0123] In einem besonderen Beispiel ist die Gelenkregion der IgG2-Immunglobuline gemäß der Erfindung halb starr und ist somit zur Kopplung von Proteinen geeignet. Bei einer solchen Anwendung können Proteine oder Peptide mit verschiedenen Substanzen, insbesondere mit Liganden über die Gelenkregion verknüpft werden, welche als Abstandhalter verwendet wird. Vorteilhafterweise umfaßt das Fragment wenigstens sechs Aminosäuren.

[0124] Es ist interessant, eine Sequenz, welche eine wiederholte Sequenz Pro-X umfaßt, wobei X irgendeine Aminosäure und vorzugsweise Gln, Lys oder Glu ist, insbesondere ein Fragment, das aus einer wenigstens dreifachen Wiederholung und vorzugsweise einer zwölfmaligen Wiederholung zusammengesetzt ist, zu verwenden, um Proteine an einen Liganden zu koppeln oder um verschiedene Proteindomänen zusammenzusetzen.

[0125] Die Gelenkregion oder ein Fragment von dieser kann ebenfalls zum Koppeln von Proteinen an Liganden oder zum Zusammensetzen unterschiedlicher Proteindomänen verwendet werden.

[0126] Übliche Kopplungstechniken sind geeignet, und insbesondere kann auf die Technik der Proteinkonstruktion durch ein Zusammensetzen klonierter Sequenzen Bezug genommen werden.

[0127] Die Antikörper gemäß dieser Erfindung könnten als Reagenzien zur Diagnose in vitro oder über Abbildungstechniken verwendet werden. Die Immunglobuline der Erfindung könnten mit Radioisotopen, chemischen oder enzymatischen Markern oder chemilumineszenten Markern markiert werden.

[0128] Als Beispiel und insbesondere in dem Fall des Nachweises oder der Beobachtung der Immunglobuline durch Abbildungstechniken ist eine Markierung wie Technetium, insbesondere Technetium 99 vorteilhaft. Diese Markierung kann zur direkten Markierung über ein Kopplungsverfahren mit den Immunglobulinen oder deren Fragmenten oder zur indirekten Markierung nach einem Schritt der Herstellung eines Komplexes mit dem Technetium verwendet werden.

[0129] Andere interessante radioaktive Markierungen sind Z. B. Indium und insbesondere Indium 111 oder Iod, insbesondere I¹³¹, I¹²⁵ und I¹²³.

[0130] Für die Beschreibung dieser Techniken wird auf die FR-Patentanmeldung, welche unter der Nr. 2649488 veröffentlicht wurde, Bezug genommen.

[0131] Bei diesen Anwendungen ist die kleine Größe des V_{HH}-Fragments ein definitiver Vorteil für das Eindringen in das Gewebe.

[0132] Die Erfindung betrifft ebenfalls monoklonale Antikörper, welche mit Anti-Idiotypen der oben beschriebenen Antikörper reagieren.

[0133] Die Erfindung betrifft ebenfalls Zellen oder nicht-menschliche Organismen, in welche Immunglobuline aus schweren Ketten kloniert wurden. Solche Zellen oder nicht-menschliche Organismen können zu dem Zweck verwendet werden, Immunglobuline aus schweren Ketten zu produzieren, welche eine gewünschte, vorher ausgewählte Spezifität aufweisen oder welche einem bestimmten Repertoire entsprechen. Sie können ebenfalls zu dem Zweck produziert werden, den Stoffwechsel der Zelle, welche diese exprimiert, zu modifizieren. In dem Fall der Modifikation des Stoffwechsels der Zellen, die mit den Sequenzen, die für Immunglobuline aus schweren Ketten codieren, transformiert wurden, werden diese produzierten Immunglobuline aus schweren Ketten wie eine antisense-DNA verwendet. Eine antisense-DNA ist gewöhnlich an der Blockierung der Expression gewisser Gene wie beispielsweise des variablen Oberflächenantigens von Trypanosomen oder anderen Pathogenen beteiligt. In ähnlicher Weise könnte die Produktion oder die Aktivität gewisser Proteine oder Enzyme durch ein Exprimieren von Antikörpern gegen dieses Protein oder Enzym innerhalb derselben Zelle gehemmt werden.

[0134] Die Erfindung betrifft ebenfalls ein modifiziertes Immunglobulin mit vier Ketten oder Fragmente von diesem, deren V_R -Bereiche teilweise durch spezifische Sequenzen oder Aminosäuren von Immunglobulinen aus schweren Ketten, insbesondere durch die Sequenzen der V_{HH} -Domäne, ersetzt wurden. Eine besondere modifizierte V_H -Domäne eines Immunglobulins mit vier Ketten ist dadurch gekennzeichnet, daß Leucin, Prolin oder Glutamin an Position 45 der V_H -Bereiche durch andere Aminosäuren und vorzugsweise durch Arginin, Glutaminsäure oder Cystein ersetzt wurden.

[0135] Eine weitere modifizierte V_H - oder V_L -Domäne eines Immunglobulins mit vier Ketten ist gekennzeichnet durch eine Verknüpfung der CDR-Schleifen miteinander oder mit den FW-Bereichen durch die Einführung gepaarter Cysteine, wobei der CDR-Bereich ausgewählt ist aus CDR_1 und CDR_3 , der FW-Bereich der FW_2 -Bereich ist und wobei sich insbesondere eines der eingeführten Cysteine in der Position 31, 33 von FW_2 oder 45 von CDR_2 und das andere in CDR_3 befindet.

[0136] Insbesondere ist die Einführung gepaarter Cysteine derart, daß die CDR_3 -Schleife mit der FW_2 - oder CDR_1 -Domäne verknüpft ist und insbesondere das Cystein der CDR_3 der V_H mit einem Cystein in Position 31 oder 33 von FW_2 oder in Position 45 von CDR_2 verknüpft ist.

[0137] In einem anderen Beispiel können Pflanzenzellen durch Immunglobuline aus schweren Ketten modifiziert werden, damit diese neue Eigenschaften oder verbesserte Eigenschaften annehmen.

[0138] Die Immunglobuline aus schweren Ketten können zur Gentherapie von Krebs verwendet werden, indem beispielsweise Antikörper verwendet werden, die gegen Proteine gerichtet sind, welche auf den Tumorzellen vorliegen.

[0139] In einem solchen Fall kann die Expression von einem oder zwei V_{HH} -Genen erhalten werden, indem Vektoren verwendet werden, die von Parvo oder Adenoviren abgeleitet sind. Die Parvoviren sind durch die Tatsache gekennzeichnet, daß ihnen eine Pathogenität fehlt oder daß diese für normale menschliche Zellen fast nicht pathogen sind, und durch die Tatsache, daß sie in der Lage sind, sich in Krebszellen leicht zu vervielfachen (Russel S. J. 1990, Immunol. Today II, 196–200).

[0140] Die Immunglobuline aus schweren Ketten werden beispielsweise in HindIII/XbaI-Stellen des infektiösen Plasmids des Maus-MVM-Virus (pMM984) kloniert (Merchlinisky et al., 1983, J. Virol. 47, 227–232) und dann unter die Kontrolle des MVM38-Promoters gebracht.

[0141] Das Gen der V_{HH} -Domäne wird durch PCR amplifiziert, indem ein 5'-Primer verwendet wird, der ein Startcodon und eine HindIII-Stelle enthält, wobei der 3'-Primer ein Stopcodon und eine XbaI-Stelle enthält.

[0142] Dieses Konstrukt wird dann zwischen die Positionen 2650 (HindIII) und 4067 (XbaI) innerhalb des Plasmids eingefügt.

[0143] Die Effizienz des Klonierens kann durch Transfektion überprüft werden. Der Vektor, welcher den Antikörper enthält, wird dann in permissive Zellen (NB-E) durch Transfektion eingeführt.

[0144] Die Zellen werden nach zwei Tagen gewonnen, und das Vorliegen der V_{HH} -Bereiche wird mit einem ELISA-Test bestimmt, indem Kaninchen-Antiserum verwendet wird, das mit dem V_{HH} -Teil reagiert.

[0145] Die Erfindung erlaubt weiterhin die Herstellung katalytischer Antikörper über verschiedene Wege. Die

Produktion von Antikörpern, die gegen Komponenten gerichtet sind, welche aktivierte Zustände von Substraten nachahmen (als Beispiel Vanadat als Komponente, welche den aktivierten Zustand des Phosphats nachahmt, um deren Phosphoesteraseaktivitäten zu erzeugen, Phosphonat als Verbindung, welche die Peptidbindung nachahmt, um Proteasen zu produzieren), erlaubt Antikörper mit einer katalytischen Funktion zu erhalten. Ein anderer Weg, um solche Antikörper zu erhalten, besteht in der Durchführung einer zufälligen Mutagenese bei Klonen von Antikörpern beispielsweise durch PCR, wobei ungewöhnliche Basen während der Amplifikation der Klone eingeführt werden. Diese amplifizierten Fragmente, welche durch PCR erhalten werden, werden dann zum Klonieren in einen geeigneten Vektor eingeführt. Deren Expression an der Oberfläche der Bakterien erlaubt den Nachweis der Klone, welche die enzymatische Aktivität aufweisen, durch das Substrat. Diese zwei Ansätze können natürlich kombiniert werden. Schließlich können auf der Grundlage der Daten, die bezüglich der Struktur verfügbar sind, z. B. der Daten, die durch Röntgenstrahlen-Kristallographie oder NMR erhalten wurden, die Modifikationen gezielt durchgeführt werden. Diese Modifikationen können durch übliche Techniken der Gentechnik oder durch vollständige Synthese durchgeführt werden. Ein Vorteil der V. der Immunglobuline aus schweren Ketten der Erfindung ist die Tatsache, daß diese hinreichend löslich sind.

[0146] Die Immunglobuline aus schweren Ketten der Erfindung können weiterhin in Pflanzenzellen, insbesondere in transgenen Pflanzen produziert werden. Als Beispiel können die Immunglobuline aus schweren Ketten in Pflanzen produziert werden, wobei das Plasmid pMon530 (Roger et al., Meth Enzym. 153, 1566, 1987), ein konstitutiver Pflanzenexpressionsvektor wie er für klassische Antikörper mit vier Ketten beschrieben wurde (Hitat et al., Nature 342, 76–78, 1989), verwendet wird, wobei wiederum die geeigneten PCR-Primer wie oben beschrieben verwendet werden, um ein DNA-Fragment in der richtigen Phase zu erzeugen.

[0147] Andere Vorteile und Charakteristika der Erfindung werden in den Beispielen und den Figuren, welche folgen, deutlich.

FIGUREN

[0148] Fig. 1: Charakterisierung und Reinigung von Kamel-IgG durch Affinitätschromatographie auf Protein-A- und Protein-G-Sepharose (Pharmacia)

(A) zeigt, nach Reduktion, das SDS-PAGE-Proteinprofil der adsorbierten und nicht adsorbierten Fraktionen des Serums von *Camelus dromedarius*. Die Fraktion, welche auf Protein A adsorbiert wurde und mit 0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure eluiert wurde, zeigt nach Reduktion (Bahn c) drei Komponenten der schweren Ketten mit entsprechend 50, 46 und 43 kD und eine leichte Kette (Kaninchen-IgG in Bahn a). Den Fraktionen, die auf einem Protein-G-Sepharose(Pharmacia)-Derivat adsorbiert wurden, welches so modifiziert wurde, daß der Albuminbindungsbereich entfernt wurde (Bahn e), und welche mit 0,1 M Gly-HCl, pH 2,7, eluiert wurden, fehlt die schwere Kette mit 46 kD, welche in der nicht adsorbierten Fraktion (Bahn f) gewonnen wird. Keine dieser Komponenten liegt in der Fraktion vor, die auf Protein A nicht adsorbiert wurde (Bahn d); Bahn b enthält die Molekulargewichtsmarker.

(B) und (C): Durch unterschiedliche Elution können Immunglobulinfraktionen, welche die schweren Ketten mit 50 und mit 43 kD enthalten, aufgetrennt werden. 5 ml des *C. dromedarius*-Serums werden auf einer 5 ml Protein-G-Sepharosesäule adsorbiert, und die Säule wird gründlich mit 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen. Nach Elution mit einem Puffer mit pH 3,5 (0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure) wird eine Komponente mit 100 kD eluiert, welche nach Reduktion eine schwere Kette mit 43 kD ergibt (Bahn 1).

[0149] Nachdem die Extinktion des Säuleneluats auf das Hintergrundniveau abgefallen ist, kann eine zweite Immunglobulinkomponente mit 170 kD mit einem Puffer mit pH 2,7 (0,1 M Glycine HCl) eluiert werden. Diese Fraktion ergibt nach Reduktion eine schwere Kette mit 50 kD und eine breite Bande der leichten Kette (Bahn 2).

[0150] Die Fraktion, welche nicht auf Protein G adsorbiert wurde, wird dann auf eine 5 ml-Protein-A-Sepharosesäule aufgebracht. Nach Waschen und Elution mit einem Puffer mit pH 3,5 (0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure) wird ein drittes Immunglobulin mit 100 kD erhalten, welches lediglich aus schweren Ketten mit 46 kD besteht (Bahn 3).

[0151] Fig. 2: Immunglobuline von *Camelus bactrianus*, *Lama vicugna*, *Lama glama* und *Lama pacos* auf Protein A (Bahnen A) und auf Protein G (Bahnen G), analysiert auf SDS-PAGE vor (A) und nach Reduktion (B)

[0152] 10 µl Serum, welche von den unterschiedlichen Spezies erhalten wurden, wurden zu Eppendorfröhrchen zugegeben, die 10 mg Protein-A- oder Protein-G-Sepharose, suspendiert in 400 µl Immunpräzipitationspuffer mit pH 8,3 (NaCl 0,2 M, Tris 0,01 M, EDTA 0,01 M, Triton X100 1%, Ovalbumin 0,1%) enthielten. Die Röhrchen wurden langsam für zwei Stunden bei 4°C gedreht. Nach Zentrifugation wurden die Pellets drei-

mal in Puffer und einmal in Puffer, bei welchem das Triton und das Ovalbumin weggelassen wurden, gewaschen. Die Pellets wurden dann in der SDS-PAGE-Probenlösung mit 70 µl pro Pellet mit oder ohne Dithiothreitol als Reduktionsmittel resuspendiert. Nach einem Kochen für 3 Minuten bei 100°C wurden die Röhrcchen zentrifugiert und die Überstände analysiert.

[0153] Bei allen untersuchten Spezies enthalten die nicht reduzierten Fraktionen (A) zusätzlich zu Molekülen mit ungefähr 170 kD ebenfalls kleinere Hauptkomponenten mit ungefähr 100 kD. In der reduzierten Probe (B) werden die aufbauenden schweren und leichten Ketten nachgewiesen. Bei allen Spezies ist eine Komponente einer schweren Kette (markiert durch einen Stern *) in dem Material vorhanden, das von Protein A eluiert wurde, fehlt aber in dem Material, das von Protein G eluiert wurde.

[0154] Fig. 3: IgG₁, IgG₂ und IgG₃ wurden aus Serum präpariert, das von einem gesunden oder mit Trypanosoma evansi infizierten Camelus dromedarius (CATT-Titer 1/160 (3)) erhalten wurde, und durch Radioimmunpräzipitation oder Western-Blotting auf ihre Aktivität gegenüber Trypanosomen hin analysiert

(A) Ein mit ³⁵S-Methionin markiertes Lysat von Trypanosoma evansi Antigenen (500.000 Zählimpulsen) wurde zu Eppendorf-Röhrcchen zugegeben, die 10 µl Serum oder 20 µg IgG₁, IgG₂ oder IgG₃ in 200 µl Immunpräzipitationspuffer mit pH 8,3 enthielten, welcher 0,1 M TLCK als Proteinaseinhibitor enthielt, und diese wurden langsam bei 4°C während 1 Stunde gedreht. Die Röhrcchen wurden dann mit 10 mg Protein-A-Sepharose ergänzt, welche in 200 µl desselben Puffers mit pH 8,3 suspendiert waren, und bei 4°C für eine weitere Stunde inkubiert.

[0155] Nach Waschen und Zentrifugation bei 15000 Upm für 12 Sekunden wurde jedes Pellet in 75 µl SDS-PAGE-Probenlösung, welche DTT enthielt, resuspendiert und für 3 Minuten bei 100°C erwärmt. Nach Zentrifugation in einer Eppendorf-Minizentrifuge bei 15000 Upm für 30 Sekunden wurden 5 µl des Überstands für die Bestimmung der Radioaktivität gesichert, und der Rest wurde durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Zählimpulse/5 µl Probe sind für jede Bahn beschriftet.

(B) 20 µg IgG₁, IgG₂ und IgG₃ aus gesunden und mit Trypanosomen infizierten Tieren wurden durch SDS-PAGE ohne vorherige Reduktion oder Erwärmung aufgetrennt. Die aufgetrennten Proben wurden dann elektrisch auf eine Nitrocellulosemembran überführt, wobei ein Teil der Membran mit Ponceau-Rot angefärbt wurde, um das Proteinmaterial zu lokalisieren, und der Rest mit 1% Ovalbumin in TST-Puffer (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05%) inkubiert wurde, um die Proteinbindungsstellen zu blockieren.

[0156] Nach dem Blockieren wurde die Membran gründlich mit TST-Puffer gewaschen und für zwei Stunden mit ³⁵S-markiertem Trypanosomen-Antigen inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde die Membran getrocknet und durch Autoradiographie analysiert. Um einen Hintergrund und eine unspezifische Bindung zu vermeiden, wurde das markierte Trypanosomenlysate durch einen 45 µm-Milliporfilter filtriert und mit Immunglobulin eines gesunden Kamels und Ovalbumin inkubiert, das auf einer Nitrocellulosemembran adsorbiert war.

[0157] Fig. 4: Durch Affinitätschromatographie auf Protein-A-Sepharose gereinigte IgG₃ des Kamels werden teilweise mit Papain verdaut und auf Protein-A-Sepharose aufgetrennt

[0158] 14 mg gereinigtes IgG₃ wurden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, welcher 2 mM EDTA enthielt, gelöst. Sie wurden durch eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C mit Mercurypapain (1 Enzym zu Protein-Verhältnis), das mit 5·10⁻⁴ M Cystein aktiviert wurde, verdaut. Der Verdau wurde durch die Zugabe von überschüssigem Iodacetamid (4·10⁻² M) (13) blockiert. Nach Zentrifugation des Verdau in einer Eppendorf-Zentrifuge für 5 Minuten bei 15000 Upm wurden die Papainfragmente auf einer Protein-A-Sepharosesäule in bindende (B) und nicht bindende (NB) Fraktionen aufgetrennt. Die bindende Fraktion wurde von der Säule mit 0,1 M Glycin-HCl-Puffer, pH 1,7, eluiert.

[0159] Fig. 5: Schematische Darstellung eines Modells für IgG₃-Moleküle, denen die leichten Ketten fehlen.

[0160] Fig. 6: Schematische Darstellung von Immunglobulinen, welche schwere Polypeptidketten aufweisen und welchen die leichten Ketten fehlen, in Bezug auf herkömmliche Immunglobuline nach dem Vier-Ketten-Modell Darstellung einer Gelenkregion

[0161] Fig. 7: Ausrichtung von 17 V_{HH}-DNA-Sequenzen von Kamel-Immunglobulinen aus schweren Ketten

[0162] Fig. 8: Expression und Reinigung des V_{HH}21-Kamel-Proteins aus E. coli

[0163] Wenn Serum von *Camelus dromedarius* auf Protein-G-Sepharose adsorbiert wird, bleibt eine merkliche Menge (25 bis 35%) der Immunglobuline (Ig) in Lösung, welche dann durch Affinitätschromatographie auf ProteinA-Sepharose gewonnen werden können ([Fig. 1A](#)). Die Fraktion, welche auf Protein G adsorbiert ist, kann in einer festgebundenen Fraktion (25%), welche aus Molekülen mit einem nicht reduzierten apparenten Molekulargewicht (MW) von 170 kD besteht, und einer schwächer gebundenen Fraktion (30 bis 45%) mit einem apparenten Molekulargewicht von 100 kD unterschiedlich eluiert werden ([Fig. 1B](#)). Die Komponente mit 170 kD ergibt, wenn sie reduziert wird, schwere Ketten mit 50 kD und große leichte Ketten mit 30 kD. Der 100 kD-Fraktion fehlen die leichten Ketten vollständig und diese scheint lediglich aus schweren Ketten zusammengesetzt zu sein, welche nach Reduktion ein apparentes MW von 43 kD aufweisen ([Fig. 1C](#)). Die Fraktion, welche nicht an Protein G bindet, kann affinitätsgereinigt werden und als eine zweite 100 kD-Komponente von einer Protein-A-Säule eluiert werden, welche nach Reduktion lediglich aus 46 kD schweren Ketten zusammengesetzt zu sein scheint.

[0164] Die Immunglobuline aus schweren Ketten, welchen die leichten Ketten fehlen, machen eine Gesamtmenge von 75% der Moleküle aus, welche an Protein A binden.

[0165] Da alle drei Immunglobuline an Protein A binden, bezeichnen wir diese als IgG: nämlich IgG₁ (leichte Kette und schwere Kette γ_1 (50 kD)), welches an Protein G bindet, IgG₂ (schwere Kette γ_2 (46 kD)), welches nicht an Protein G bindet, und IgG₃ (schwere Kette γ_3 (43 kD)), welches an Protein G bindet. Es besteht eine Möglichkeit, daß diese drei Unterklassen weiter unterteilt werden können.

[0166] Eine vergleichende Untersuchung der Kamelartigen der alten Welt (*Camelus bactrianus* und *Camelus dromedarius*) und der Kamelartigen der neuen Welt (*Lama pacos*, *Lama glama*, *Lama vicugna*) zeigte, daß Immunglobuline aus schweren Ketten bei allen untersuchten Spezies gefunden werden, auch wenn kleinere Unterschiede bei dem apparenten Molekulargewicht und dem Anteil vorlagen. Die Kamelartigen der neuen Welt unterscheiden sich von den Kamelartigen der alten Welt darin, daß sie ein größeres IgG₃-Molekül (Immunglobulin aus schweren Ketten, das an Protein G bindet) aufweisen, bei welchem die aufbauenden schweren Ketten ein apparentes Molekulargewicht von 47 kD aufweisen ([Fig. 2](#)).

[0167] Die Fülle der Immunglobuline aus schweren Ketten im Serum der Kamelartigen wirft die Frage auf, was deren Rolle bei der Immunantwort ist und insbesondere, ob diese eine Antigenbindungsspezifität aufweisen und, wenn dieses so sein sollte, wie umfassend deren Repertoire ist. Diese Frage könnte beantwortet werden, indem die Immunglobuline aus mit *Trypanosoma evansi* infizierten Kamelen (*Camelus dromedarius*) untersucht werden.

[0168] Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Fraktionen von IgG₁, IgG₂, IgG₃ aus dem Serum eines gesunden Kamels und aus dem Serum von Kamelen mit hohem Antitrypanosomentiter, gemessen durch den Card-AgglutinationsTest (3), präpariert. Bei einer Radioimmunpräzipitation wurde gezeigt, daß IgG₁, IgG₂ und IgG₃, welche aus einem infizierten Kamel stammten, das eine starke Heterogenität und Komplexität des Repertoires zeigte ([Fig. 3A](#)), eine große Anzahl von Antigenen banden, welche in einem mit ³⁵S-Methionin markierten Trypanosomenlysat vorlagen.

[0169] Bei Blotting-Experimenten bindet ein mit ³⁵S-Methionin markiertes Trypanosomenlysat an durch SDS-PAGE aufgetrennte IgG₁, IgG₂ und IgG₃, die aus infizierten Tieren erhalten wurden ([Fig. 3B](#)).

[0170] Dieses führt uns zu der Schlußfolgerung, daß die IgG₂ und IgG₃ aus schweren Ketten der Kamelartigen echte antigenbindende Antikörper sind.

[0171] Ein immunologisches Paradigma lautet, daß ein umfassendes Antikörperrepertoire durch die Kombination des Repertoires der variablen V-Bereiche der leichten und schweren Kette erzeugt wird (6). Die Immunglobuline aus schweren Ketten des Kamels scheinen diesem Paradigma zu widersprechen.

[0172] Immunglobuline sind durch ein komplexes I. E. F. (isoelektrische Fokussierung)-Muster gekennzeichnet, welches deren extreme Heterogenität widerspiegelt. Um zu bestimmen, ob die zwei schweren Ketten, welche das IgG₂ und IgG₃ aufbauen, identisch sind oder nicht, wurde das isoelektrische Fokussierungsmuster (I. E. F.)-Muster vor und nach der Trennung der Ketten durch Reduktion und Alkylierung unter Verwendung von Iodacetamid als Alkylierungsmittel beobachtet.

[0173] Da dieses Alkylierungsmittel keine zusätzlichen Ladungen in das Molekül einführt, haben die Monomere, welche aus der Reduktion und Alkylierung eines Homodimers aus schweren Ketten resultieren, praktisch denselben isoelektrischen Punkt wie das Dimer, wogegen sich die Monomere, wenn sie aus einem Heterodimer aus schweren Ketten stammen, in den meisten Fällen hinreichend in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden, so daß sie bei der I. E. F. ein unterschiedliches Muster erzeugen.

[0174] Nach Reduktion und Alkylierung durch Iodacetamid wird das beobachtete Muster für die IgG₂ und IgG₃ aus *Camelus dromedarius* nicht modifiziert, was zeigt, daß diese Moleküle jeweils aus zwei identischen schweren Ketten zusammengesetzt sind, welche zu derselben Position wandern wie das nicht reduzierte Molekül, von welchem sie abstammen.

[0175] Im Gegensatz dazu ist das I. E. F.-Muster von IgG₁ nach der Reduktion vollständig modifiziert, da der isoelektrische Punkt jedes Moleküls durch die Kombination der isoelektrischen Punkte der leichten und schweren Ketten bestimmt wird, welche nach der Trennung jeweils zu einer anderen Position wandern.

[0176] Diese Funde zeigen, daß die schweren Ketten allein ein umfassendes Repertoire erzeugen können, und stellen den Beitrag der leichten Kette zu dem nützlichen Antikörperrepertoire in Frage. Wenn diese Notwendigkeit verneint wird, welche andere Rolle spielt dann die leichte Kette.

[0177] Normalerweise neigen isolierte schwere Ketten aus Säugetierimmunglobulinen dazu, beträchtlich zu aggregieren, werden aber nur durch leichte Ketten solubilisiert (8, 9), welche an die C_H1-Domäne der schweren Kette binden.

[0178] Bei Menschen und bei Mäusen erzeugt eine Anzahl spontaner oder induzierter Myelome ein pathologisches Immunglobulin, das nur aus schweren Ketten zusammengesetzt ist (Schwerkettenkrankheit). Diese schweren Ketten des Myelomprotein tragen Deletionen in den C_H1- und V_{HH}-Domänen (10). Der Grund, warum schwere Ketten mit voller Länge bei solchen pathologischen Immunglobulinen nicht zu sezernierten schweren Ketten führen, scheint sich von der Tatsache abzuleiten, daß an der Synthese von Ig ein faltungsförderndes Protein, das schwere Ketten eines Immunglobulins bindende Protein oder BIP (11), welches normalerweise durch die leichte Kette ersetzt wird (12), beteiligt ist. Es ist möglich, daß die ursprüngliche Rolle der leichten Kette bei den Immunglobulinen nach dem Vier-Ketten-Modell darin besteht, für die Faltung der schweren Kette verantwortlich zu sein, und daß das Entstehen des Repertoires der leichten Ketten nur ein evolutionärer Bonus war.

[0179] Die γ 2- und γ 3-Ketten der Kamelartigen sind beträchtlich kürzer als die normale γ -Kette aus Säugetieren. Dieses würde nahelegen, daß Deletionen in der C_H1-Domäne aufgetreten sind. Unterschiede in den Größen der γ 2- und γ 3-Immunglobuline der Kamelartigen der alten und neuen Welt legen nahe, daß Deletionen in mehrere evolutionären Schritten, insbesondere in der C_H1-Domäne aufgetreten sind.

II DEN IMMUNGLOBULINEN AUS SCHWEREN KETTEN DER KAMELARTIGEN FEHLT DIE C_H1-DOMÄNE

[0180] Die Strategie, welche verfolgt wurde, um die Primärstruktur des Immunglobulins aus schweren Ketten zu untersuchen, ist eine Kombination aus Protein- und cDNA-Sequenzierung; die Protein-Sequenzierung ist notwendig, um Sequenzbereiche zu identifizieren, die für jedes Immunglobulin charakteristisch sind. Der N-Terminus des Immunglobulins, welcher von dem Repertoire des variablen Bereichs der schweren Kette abgeleitet ist, ergibt nur die Information über die V_{HH}-Untergruppen (variabler Bereich der schweren Kette) und kann nicht für eine Identifikation der Klasse oder Unterklasse verwendet werden. Dieses bedeutet, daß Sequenzdaten von inneren enzymatischen oder chemischen Spaltungsstellen erhalten werden mußten.

[0181] Eine Kombination von Papainverdau und Protein-A-Affinitätschromatographie erlaubte die Trennung verschiedener Fragmente, was eine Information über die allgemeine Struktur der IgG₃ ergab.

[0182] Die IgG₃ des Kamels (*Camelus dromedarius*), welche durch Affinitätschromatographie auf Protein-A-Sepharose gereinigt wurden, wurden teilweise mit Papain verdaut, und der Verdau wurde auf Protein-A-Sepharose in bindende und nicht bindende Fraktionen aufgetrennt. Diese Fraktionen wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen analysiert (**Fig. 4**).

[0183] Die gebundene Fraktion enthielt zwei Komponenten, eine mit 28 kD und eine mit 14,4 kD, zusätzlich zu nicht gespaltenem oder teilweise gespaltenem Material. Diese wurden durch Gelelektrophorese (auf präparativen 19% SDS-PAGE-Gelen) unter nicht reduzierenden Bedingungen gut aufgetrennt und wurden weiter

durch Elektroelution (in 50 nM Ammoniumbicarbonat, 0,1% (w/v) SDS unter Verwendung eines BioRad-Elektroelutionsgeräts) gereinigt. Nach Lyophilisierung dieser elektroeluierten Fraktionen wurde das verbleibende SDS eliminiert, indem das Protein durch die Zugabe von 90% Ethanol, Mischen und Inkubieren der Mischung über Nacht bei -20°C ausgefällt wurde (14). Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugieren (15000 Upm, 5 Minuten) in einem Pellet gesammelt und wurde zur Proteinsequenzierung verwendet. Eine N-terminale Sequenzierung wurde unter Verwendung der automatisierten Edman-Chemie eines Applied-Biosystem-477A-Proteinsequenziergeräts mit gepulster Flüssigkeit durchgeführt. Aminosäuren wurden als ihre Phenylthiohydantoin(PTH)-Derivate unter Verwendung eines PTH-Analysegeräts Applied Biosystem 120 identifiziert. Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von Applied Biosystems gekauft. Die Analyse der chromatographischen Daten wurde unter Verwendung der Applied-Biosystems-Software, Version 1.61, durchgeführt. In jedem Fall wurde die computerunterstützte Sequenzanalyse durch direkte Ansicht der Chromatogramme aus dem PTH-Analysegerät bestätigt. Proben zur Proteinsequenzierung wurden entweder in 50% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) (28 kD-Fragment) oder 100% TFA (14 kD-Fragment) gelöst. Proben des gelösten Proteins, welche 2000 pmol (28 kD-Fragment) oder 500 pmol (14 kD-Fragment) entsprachen, wurden auf TFA-behandelte Glasfaserscheiben aufgetragen. Die Glasfaserscheiben wurden mit BioBrene (3 mg) beschichtet und vor der Anwendung einmal vorab einem Zyklus unterzogen.

[0184] Eine N-terminale Sequenzierung des 28 kD-Fragments ergibt eine Sequenz, welche zu dem N-terminalen Teil der $\gamma\text{-C}_{\text{H}2}$ -Domäne und somit zu dem N-terminalen Ende des Fc-Fragments homolog ist. Die N-terminale Sequenz des 14,4 kD-Fragments entspricht dem letzten Lysin einer $\gamma\text{-C}_{\text{H}2}$ - und dem N-terminalen Ende einer $\gamma\text{-CH}_3$ -Domäne (Tabelle 1). Das Molekulargewicht (MW) der Papainfragmente und die Identifizierung ihrer N-terminalen Sequenzen führte uns zu der Schlußfolgerung, daß die $\text{C}_{\text{H}2}$ - und $\text{C}_{\text{H}3}$ -Domänen der schweren $\gamma 3$ -Ketten eine normale Größe aufweisen und daß die Deletion entweder in der $\text{C}_{\text{H}1}$ - oder in der V_{HH} -Domäne auftreten muß, um die verkürzte $\gamma 3$ -Kette zu erzeugen. Die Fraktionen, welche nicht an Protein-ASepharose binden, enthalten zwei Banden mit 34 und 17 kD, welche bei SDS-PAGE diffuser sind, was zeigt, daß sie aus dem variablen N-terminalen Teil des Moleküls stammen (**Fig. 4**).

[0185] Nach der Reduktion findet man eine einzige diffuse Bande mit 17 kD, was zeigt, daß die 34 kD ein über ein Disulfid gebundenes Dimer der Komponente mit 17 kD sind. Das 34 kD-Fragment enthält anscheinend das Gelenk und die N-terminale Domäne V_{HH} .

[0186] Die Proteinsequenzdaten können verwendet werden, um degenerierte Oligonukleotidprimer zu konstruieren, welche eine PCR-Amplifikation der cDNA oder der genomischen DNA ermöglichen.

[0187] Es wurde gezeigt, daß die Zellen aus geprägten Milzzellen des Kamels mit Kaninchen- und anti-Kamel-Immunglobulinen reagierten, und daß die Milz somit ein Syntheseort von wenigstens einer Immunglobulinklasse war. Daher wurde cDNA aus der mRNA der Milz des Kamels synthetisiert. Die Bedingungen für die Isolierung der RNA waren die folgenden: Die Gesamt-RNA wurde aus der Milz des Dromedars durch das Guanidium-Isothiocyanat-Verfahren (15) isoliert. mRNA wurde mit paramagnetischen Oligo-TKügelchen gereinigt.

[0188] Die cDNA-Synthese wird erhalten, indem 1 μg mRNA-Matrize, ein Oligo-dT-Primer und reverse Transcriptase (BOEHRINGER MAN) verwendet werden. cDNA des zweiten Stranges wird erhalten, indem RNase H und E. coli-DNA-Polymerase 1 gemäß den Bedingungen, die von dem Lieferanten angegeben werden, verwendet werden.

[0189] Relevante Sequenzen wurden PCR-amplifiziert: 5 ng cDNA wurden durch PCR in einer Reaktionsmischung von 100 μl (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 0,01% (w/v) Gelatine, 200 μM jedes dNTP und 25 pmol jedes Primers), welche mit Mineralöl (Sigma) überschichtet war, amplifiziert.

[0190] Degenerierte Primer, welche EcoRI- und KpnI-Stellen enthielten, [wurden verwendet] und es folgte eine Klonierung in pUC 18. Nach einer Runde von Denaturieren und Reassoziierenlassen (94°C für 5 Minuten und 54°C für 5 Minuten) wurden zwei Einheiten Taq-DNA-Polymerase zu der Reaktionsmischung zugegeben, bevor diese 35 Amplifikationszyklen: 1 Minute bei 94°C (Denaturieren), 1 Minute bei 54°C (Reassoziierenlassen), 2 Minuten bei 72°C (Verlängern), unterzogen wurde. Um DNA-Sequenzen zwischen V_{HH} - und $\text{C}_{\text{H}2}$ -Domänen zu amplifizieren, (# 72 Klone), wurde die PCR unter denselben Bedingungen durchgeführt, mit der Ausnahme, daß die Reassoziierungstemperatur auf 60°C erhöht wurde.

[0191] Ein untersuchter Klon (# 56/36) wies eine Sequenz auf, welche dem N-terminalen Teil einer $\text{C}_{\text{H}2}$ -Domäne entsprach, die zu der Sequenz des 28 kD-Fragments identisch war. Die Verfügbarkeit dieser Sequenzdaten ermöglichte die Konstruktion eines genauen 3'-Primers und die Klonierung des Bereichs zwischen dem

N-terminalen Ende der V_{HH} - und der C_{H2} -Domäne.

[0192] 5'-Primer, welche der Maus- V_{HH} (16) entsprachen und eine XhoI-Restriktionsstelle enthielten, wurden in Verbindung mit dem 3'-Primer, in welchen eine KpnI-Stelle eingeführt worden war, verwendet, und die amplifizierten Sequenzen wurden in pBluescript^R kloniert. Der Klon # 56/36, welcher zwei innere HaeIII-Stellen aufwies, wurde mit diesem Enzym verdaut, um eine Sonde herzustellen, um PCR-positive Klone zu identifizieren.

[0193] Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf einem 1,2%igen (w/v) Agarosegel überprüft. Ein Aufreinigen der PCR-Produkte schloß eine Phenol-Chloroform-Extraktion, gefolgt von einer weiteren Reinigung durch HPLC (GEN-PAC FAX-Säule, Waters) und schließlich ein Verwenden des MERMAID- oder GENE-CLEAN II-Kits (BIO 101, Inc), wenn dieses geeignet war, ein. Nach diesen Reinigungsschritten wurde die amplifizierte cDNA dann mit EcoRI und KpnI für die Klone der Serie # 56 und mit XhoI und KpnI für die Klone der Serie # 72 verdaut. Eine abschließende Phenol-Chloroform-Extraktion ging der Ligation in pUC 18 (Klone der Serie # 56) oder in pBluescript^R (Klone der Serie # 72) voraus.

[0194] Alle erhaltenen Klone waren kleiner als die 860 Basenpaare, die man erwarten würde, wenn diese einen vollständigen V_{HH} - und C_{H1} -Bereich besäßen. Partielle Sequenzdaten, welche dem N-Terminus des V_{HH} -Bereichs entsprachen, zeigen, daß von 20 Klonen drei identisch und möglicherweise nicht unabhängig waren. Die erhaltenen Sequenzen ähneln der menschlichen Untergruppe III und den Mausuntergruppen IIIa und IIIb (Tabelle 2).

[0195] Klone, welche zwei unterschiedlichen Sätzen von C_{H2} -Proteinsequenzen entsprachen, wurden erhalten. Ein erster Satz von Sequenzen (# 72/41) wies einen N-terminalen C_{H2} -Bereich auf, der mit dem identisch war, der durch Proteinsequenzierung der 28 kD-Papainfragmente der schweren $\gamma 3$ -Kette erhalten wurde, eine kurze Gelenkregion, welche drei Cysteine enthielt, und eine variable Region, welche den Resten der Gerüstregion (FR4) entsprach, die durch die J-Minigene codiert wurden, welche an das Gelenk angrenzten. Die C_{H1} -Domäne fehlt vollständig. Diese cDNA entspricht der $\gamma 3$ -Kette (Tabelle 4).

[0196] Bei einer engverwandten Sequenz (# 72/1) ist das Prolin an Position 259 durch Threonin ersetzt.

[0197] Die Sequenz, welche der C_{H3} und dem verbleibenden Teil der C_{H2} entsprach, wurde durch PCR der cDNA erhalten, indem als KpnI-Primer ein Poly-T verwendet wurde, bei welchem eine KpnI-Restriktionsstelle an dem 5'-Ende eingefügt worden war. Die gesamte Sequenz der $\gamma 3$ -Kette entspricht einem Molekulargewicht (MW), welches in guter Übereinstimmung mit den Daten ist, die aus der SDS-PAGE-Elektrophorese erhalten wurden.

[0198] Die Sequenz dieser $\gamma 3$ -Kette zeigt Ähnlichkeiten mit anderen γ -Ketten, außer daß ihr die C_{H1} -Domäne fehlt, wobei die V_{HH} -Domäne benachbart zu dem Gelenk liegt.

[0199] Eines oder alle drei Cysteine könnten möglicherweise für den Zusammenhalt der zwei $\gamma 3$ -Ketten verantwortlich sein.

[0200] Diese Ergebnisse haben es uns erlaubt, ein Modell für das IgG₃-Molekül auf der Grundlage der Sequenz und der Papainspaltung zu definieren ([Fig. 5](#)).

[0201] Papain kann das Molekül auf jeder Seite der Gelenk-Disulfide und ebenfalls zwischen C_{H2} und C_{H3} spalten. Unter nichtreduzierenden Bedingungen können die V_{HH} -Domänen von IgG₃ als disulfidverknüpftes Dimer oder als Monomer isoliert werden, was von der Stelle der Papainspaltung abhängt.

[0202] Ein zweiter Satz von Klonen # 72/29 wies eine leicht unterschiedliche Sequenz für die C_{H2} auf und war durch ein sehr langes Gelenk gekennzeichnet, dem unmittelbar die variable Domäne vorausging. Diese Gelenkregion weist an ihrem C-terminalen Ende drei Cysteine in einer Sequenz auf, die zu dem $\gamma 3$ -Gelenk homolog ist. Ein solcher zweiter Satz von Klonen könnte die IgG₂-Unterklasse repräsentieren. Für den konstanten Teil der $\gamma 3$ und ebenfalls für die vermeintliche $\gamma 2$ sind die meisten Klone identisch, wobei sie die $\gamma 2$ - oder $\gamma 3$ -spezifischen Sequenzen zeigen. Einige wenige Klone wie z. B. # 72/1 zeigen jedoch kleinere Unterschiede. Beispielsweise werden in dem Fall der Klone # 72/1 zwei Nukleotidunterschiede nachgewiesen.

[0203] Mehrere cDNA's von V_{HH} -Bereichen wurden nun vollständig oder teilweise sequenziert, mit Ausnahme einer kurzen Strecke am N-terminalen Ende, welche vom Primer abgeleitet ist.

[0204] Nach der Translation zeigt die Mehrheit die charakteristischen Sequenzen der schweren Kette Ser₂₁, Cys₂₂ und Tyr₉₀, Tyr₉₁, Cys₉₂ der Disulfidbrücke innerhalb des V_{HH}-Bereichs, welche die Reste 22 und 92 verknüpft. All diese Klone weisen eine Sequenz auf, welche den Resten der Gerüstregion 4 (FR4) des variablen Bereichs entspricht, welche der postulierten Gelenksequenz unmittelbar vorausgeht (Tabelle 3). Diese Sequenz wird durch die J-Minigene erzeugt und ist in der Mehrzahl der Fälle ähnlich zu der Sequenz, die von den menschlichen und Maus-J-Minigenen codiert wird. Die Sequenzlänge zwischen dem Bereich Cys₉₂ und dem C-terminalen Ende der V_{HH}-Bereiche ist variabel und reicht bei den bestimmten Sequenzen von 25 bis 37 Aminosäuren, wie man aufgrund der Umordnungen der J- und D-Minigene erwarten könnte, welche in der Länge variieren.

[0205] Mehrere wichtige Fragen werden durch die alleinige Existenz dieser Immunglobuline aus schweren Ketten in einer nicht pathologischen Situation aufgeworfen. Zuerst, sind dieses echte Antikörper? Die Immunglobuline aus schweren Ketten, welche aus mit Trypanosomen infizierten Kamelen erhalten wurden, reagieren mit einer großen Anzahl von Parasiten-Antigenen, wie in Teil I dieser Beispiele gezeigt ist. Dieses impliziert, daß das Immunsystem der Kamelartigen eine umfassende Anzahl von Bindungsstellen erzeugt, die aus einzelnen V_{HH}-Domänen zusammengesetzt sind. Dieses wird durch die Diversität der V_{HH}-Bereiche der Immunglobuline aus schweren Ketten bestätigt, welche durch PCR erhalten werden.

[0206] Die zweite Frage ist "Wie werden diese sezerniert?". Die Sekretion der schweren Ketten der Immunglobuline, welche die Immunglobuline nach dem Vier-Ketten-Modell aufbauen, findet unter normalen Bedingungen nicht statt. Ein faltungsunterstützendes Protein, das schwere Ketten-Bindungsprotein oder BIP-Protein, hindert schwere Ketten daran, sezerniert zu werden. Nur wenn die leichte Kette das BIP-Protein in dem endoplasmatischen Retikulum ersetzt, kann die Sekretion stattfinden (13).

[0207] Dem Dimer aus schweren Ketten, das im Serum von Menschen oder Mäusen mit der sogenannten "Schwerkettenkrankheit" gefunden wird, fehlen die C_H1-Domänen, von welchen angenommen wird, daß sie die BIP-Stelle beherbergen (14). In Abwesenheit dieser Domäne kann das BIP-Protein nicht länger binden und den Transport der schweren Ketten verhindern.

[0208] Das Vorliegen in Kamelen einer IgG₁-Klasse, die aus schweren und leichten Ketten zusammengesetzt ist, welche zwischen 25% und 50% der gesamten IgG-Moleküle ausmacht, wirft ebenfalls das Problem auf, wie eine Reifung und ein Wechseln zwischen den Klassen stattfindet und welches die Rolle der leichten Kette ist. Die leichte Kette der Kamelartigen scheint ungewöhnlich groß und heterogen zu sein, wenn sie in einer SDS-PAGE untersucht wird.

[0209] Die größte Abmessung einer isolierten Domäne beträgt 40 Å, und die maximal erreichbare Spanne zwischen den Bindungsstellen eines herkömmlichen IgG mit C_H1 und V_{HH} wird in der Größenordnung von 160 Å liegen (2V_{HH} + 2C_H1) (19). Die Deletion der C_H1-Domäne bei den zwei Typen von Antikörpern aus schweren Ketten, welchen die leichten Ketten fehlen, die schon sequenziert wurden, weist als Ergebnis eine Modifikation dieser maximalen Spanne auf (**Fig. 6**). Bei dem IgG₃ liegt der äußerste Abstand zwischen den äußeren Enden der V_{HH}-Bereiche in der Größenordnung von 80 Å (2V_{HH}). Dieses könnte eine ernste Beschränkung für ein Agglutinieren oder eine Quervernetzung sein. Bei dem IgG₂ wird dieses durch den extrem langen Bereich des Gelenks kompensiert, welches aus einer zwölfwachen Wiederholung der Sequenz Pro-X (wobei X Gln, Lys oder Glu ist) zusammengesetzt ist und N-terminal zu den Disulfidbrücken des Gelenks lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu trägt bei dem menschlichen IgG₃ das sehr lange Gelenk, welches anscheinend ebenfalls als Folge einer Sequenzverdopplung entstand, nicht zu einem Anstieg des Abstands, welcher sich über die zwei Bindungsstellen erstreckt, bei, da dieses Gelenk mit Disulfidbrücken durchsetzt ist.

[0210] Die einzelne V_{HH}-Domäne könnte möglicherweise ebenfalls eine beträchtliche Rotationsfreiheit der Bindungsstelle gegenüber der Fc-Domäne erlauben.

[0211] Anders als die schweren Ketten eines Myeloms, welche möglicherweise aus einer C_H1-Deletion bei einer einzelnen Antikörper-produzierenden Zelle resultieren, oder Antikörpern aus schweren Ketten, welche durch Expression-Klonieren hergestellt wurden (15), sind die Antikörper aus schweren Ketten der Kamelartigen (welchen die leichten Ketten fehlen) in einer normalen immunologischen Umgebung entstanden, und es wird erwartet, daß diese eine selektive Verfeinerung bei der Spezifität und Affinität durchlaufen haben, welche die Reifung der B-Zellen begleitet.

Expression und Reinigung des Kamelproteins V_{HH}21 (DR21 in **Fig. 7**) aus E. Coli

[0212] Die Klone können in mehreren Typen von Expressionsvektoren exprimiert werden. Als ein Beispiel wurden unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Vektors Immun-PBS (Huse et al.: Science (1989) 246, 1275) Klone, die in Bluescript[®] gemäß dem oben beschriebenen Verfahren erzeugt wurden, durch PCR gewonnen, wobei derselbe XhoI-haltige 5'-Primer und ein neuer 3'-Primer, welcher den Resten 113–103 in der Gerüstregion der Immunglobuline entsprach, in welchen eine SpeI-Stelle eingebaut wurde: TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG, verwendet wurden. Dieses Verfahren erlaubte die Klonierung der V_{HH} in die XhoI/SpeI-Stelle des Immun-PBS-Vektors. Jedoch war das 3'-Ende des Gens nicht in der gleichen Phase mit dem Identifikations-"Tag" und dem Stopcodon des Vektors. Um dieses zu erreichen, wurde das Konstrukt mit SpeI geschnitten, und die Überhänge von vier Basen wurden aufgefüllt, wobei das Klenow-Fragment verwendet wurde, wonach der Vektor erneut ligiert wurde.

– Das Expressionsvektorplasmid ipBS (immunopBS) (Stratagene) enthält eine pel B-Leitsequenz, welche für eine Expression der Immunglobulinketten in E. coli unter Kontrolle des Promoters pLAC verwendet wird, eine Ribosomenbindungsstelle und Stopcodons. Zusätzlich enthält es eine Sequenz für ein C-terminales Decapeptid-Tag.

– E. coli JM101, welche das ipBS-V_{HH}21-Plasmid enthielten, wurden in 1 l TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 0,1% Glucose bei 32°C wachsen gelassen. Die Expression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) bei einer OD₅₅₀ von 1,0 induziert. Nach einer Induktion über Nacht bei 28°C wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g für 10 Minuten (4°C) geerntet und in 10 ml TES-Puffer (0,2 M Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 0,5 M Sucrose) resuspendiert. Die Suspension wurde für 2 Stunden auf Eis gehalten. Periplasmatische Proteine wurden durch osmotischen Schock durch Zugabe von 20 ml TES-Puffer, welcher 1:4 v/v mit Wasser verdünnt war, entfernt, für 1 Stunde auf Eis gehalten und anschließend bei 12000 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die überstehende periplasmatische Fraktion wurde gegen Tris-HCl pH 8,8, NaCl 50 mM dialysiert, auf eine Schnellfluß-Q-Sepharose(Pharmacia)-Säule aufgetragen, die vorher mit dem obigen Puffer gewaschen wurde, und mit einem linearen Gradienten von 50 mM bis 1 M NaCl im Puffer eluiert.

[0213] Fraktionen, welche das V_{HH}-Protein enthielten, wurden weiter auf einer Superdex 75-Säule (Pharmacia) gereinigt, die mit PBS-Puffer (0,01 M Phosphate pH 7,2, 0,15 M NaCl) äquilibriert war. Die Ausbeute des gereinigten V_{HH}-Proteins variiert von 2 bis 5 mg/l Zellkultur.

[0214] Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert (I). Eine positive Identifizierung des V_{HH}-Kamel-Antikörperfragments wurde durch eine Western Blot-Analyse durchgeführt, wobei ein Antikörper, der in Kaninchen gegen das gereinigte Kamel-IgGH₃ hervorgerufen wurde, und ein anti-Kaninchen-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet wurden (II).

[0215] Als Proteinstandards (Pharmacia) wurden periplasmatische Proteine verwendet, die aus 1 ml IPTG-induzierten JM101/ipBS V_{HH}21 hergestellt wurden. **Fig. 8** zeigt: C, D: Fraktionen aus der schnellen S-Sepharose-Säulenchromatographie (C: eluiert bei 650 mM NaCl, D: eluiert bei 700 mM NaCl), E, F: Fraktionen von der Superdex 75-Säulenchromatographie.

[0216] Wie man sehen kann, wird die Hauptverunreinigung durch Ionenaustauschchromatographie eliminiert und die Hauptmenge der verbleibenden Verunreinigungen wird durch Gelfiltration eliminiert.

Kamel -	γ 3 28Kd	- L P G G P S V F V F P P K P K P K P	250	260	270
Klon	# 72/1	- L P G G P S V F V F P T K P K P K P			- - X G X P - -
Klon	# 72/4	- L P G G P S V F V F P P K P K P K P			- - I S G R P - -
Klon	# 72/29	- L L G G P S V F I F P P K P K P K P			- - I S G R P - -
menschliches γ 1 γ 3		- L L G G P S V F L F P P K P K P K P			- - I S R T P - -
CH2	γ 2	- V A - G P S V F L F P P K P K P K P			- - I S R T P - -
	γ 4	- F L G G P S V F L F P P K P K P K P			- - I S R T P - -

CH2 | CH3

		360	370
Kamel -	γ 3 14Kd	- K G Q T R E P Q V Y T L A P X R L E L - -	
menschliches γ 1		- K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L - -	
CH2/CH3	γ 2, γ 3	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M - -	
	γ 4	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M - -	

Tabelle 1

Vergleich der N-terminalen CH2- und CH3- Sequenzen des Kamels mit den translatierten cDNA-Sequenzen der Kamel Immunoglobuline und mit den entsprechenden menschlichen γ -Sequenzen. (Numrierung gemäß Kabat et al. (1987) (7)).

von Primer abgeleitet	10	20	30
	G G S V Q T G G S L R L S C E I S G L T F D		# 72/4
	G G S V Q T G G S L R L S C A V S G F S F S		# 72/3
	G G S E Q G G S L R L S C A I S G Y T Y G		# 72/7
	G G S V Q P G G S L T L S C T V S G A T Y S		# 72/17
	G G S V Q A G G S L R L S C T G S G F P Y S		# 72/18
D V Q L V A S G G S V G A G G S L R L S C T A S G D S F S			# 72/2
E V K L V E S G G G L V E P G G S L R L S C A T S G F T F S			Maus-V _H III _A
E V Q L L S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S			menschliches-V _H III

Tabelle 2

Ein Vergleich der N-terminalen Fr-1-Regionen der Kamel-V_{HH} mit einem menschlichen Protein der Untergruppe V_HIII und einem Mausprotein der Untergruppe V_HIII_A.

Die unveränderlichen für die Untergruppe spezifischen Reste sind grau getönt.

	Gerüstregion 4	J-Gene
menschlich	W G Q G T L V T V S S	J1, J4, J5
	W G R G T L V T V S S	J2
	W G Q G T T V T V S S	J6
	W G Q G T M V T V S S	J3
Maus	W G Q G T T L T V S S	J1
	W G Q G T L V T V S S	J2
	W G Q G T S V T V S A	J3
	W G A G T T V T V S S	J4
		cDNA-Klone
Kamel	W G Q G T Q V T V S S	Klone
	W G Q G T Q V T V S S	# 72/19 = # 72/3
	W G Q G T L V T V S S	1 Klon
	W G R G T Q V T V S S	# 72/24
	W G Q G T H V T V S S	# 72/21
	W G Q G I Q V T A S S	# 72/16

Tabelle 3

Vergleich einiger Reste der Gerüstregion 4, welche in dem V_{HH} -Bereich des Kamels gefunden werden, mit den Resten der Gerüstregion 4, welche dem Konsensusbereich der menschlichen und der Maus-J-Minigene entsprechen.


```

10          20          40
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASG CDR1 WVRQA PGKGLEWVS CDR2
GG SVQGGGSLRL SCAISG CDR1 WFREG PGKEREGIA CDR2
GG SVQAGGSLRL SCASSS CDR1 WYRQA PGKREFEVS CDR2
    
```

```

70          80          90          110
RFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAR CDR3 WGQGTLLVT VSS
RFTIS QDSTLKTMYL LMNMLKPEDTGT YCAA CDR3 WGQGTQVT VSS
RFTIS QDSAKNTVYL QMNSLKPEDTAMY YCKI CDR3 WGQGTQVT VSS
    
```

Kamel - V _{HH}	Gelenk	C _H ²
WGQGTQVT VSS	GTNEVCKCPKCP	APELLGG PSVFVFP
WGQGTQVT VSS	EPKIPQPKPQFP	QPKPKPQ
		KPEPECTCPKCP
		APELLGG PSVFIFP

TABELLE 5(1)

menschliches CH ¹	Gelenk	CH ²
menschliches gamma 3	KVDKRV ELKTPDLGDTTHTCPRCP EPKCSDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCP	APPELLGG PSVFLFP
menschliches gamma 1	KVDKK — AEPKSCDKTHTCFFCP	APPELLGG PSVFLFP
menschliches gamma 2	KVKVTV — ERKCCVRCPPCP	APPVAG - PSVFLFP
menschliches gamma 4	KVDKRV — ESKYGPPPCPSCP	APBFLGG PSVFLFP

TABELLE 5(2)

REFERENZEN

1. Ward, E. S., Güssow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T. und Winter G., Nature 341, 544–546 (1989).
2. Ungar-Waron H., Eliase E., Gluckman A. und Trainin Z., Isr. J. Vet. Med. 43, 198–203 (1987).
3. Bajyana Songa E. und Hamers R., Ann. Soc. Beige Med. trop. 68, 233–240 (1988).
4. Edelman G. M., Olins D. E., Gally J. A. und Zinder N. D., Proc. Nat. Acad. Sc. 50, 753 (1963).
5. Franek P. und Nezlín R. S., Bickhimiya 28, 193, (1963).
6. Roitt I. M., Brostoff J. und Male D. K., Immunology, Gower Med. Pub. London, New-York, S. 9.2. (1985).
7. Schiffer M., Girling R. L., Ely K. R. und Edmundson B., Biochemistry 12, 4620–4631 (1973).
8. Fleischman J. B., Pain R. H. und Porter R. R., Arch. Biochem. Biophys, Suppl. 1, 174 (1962).
9. Roholt O., Onoue K. und Pressman D., PNAS 51, 173–178 (1964).
10. Seligmann M., Mihaesco E., Preud'homme J. L., Danon P. und Brouet J. C., Immunological Rev. 48, 145–167 (1979).
11. Hendershot L., Bole D., Köhler G. und Kearney J. F., The Journal of Cell Biology 104, 761–767 (1987).
12. Hendershot L. M., The Journal of Cell Biology 111, 829–837 (1990).
13. Hamers-Casterman, C., E. Wittouck, W. Van der Loo und R. Hamers, Journal of Immunogenetics 6, 373–381 (1979).
14. Applied Biosystems – Ethanol Precipitation of Electro Eluted Electrolysed Sample. Ausgabe Nr. 27.
15. Maniatis, T., E. F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1988).
16. Sastry et al., PNAS 86, 5728, (1989).
17. Sanger, F., S. Nickien und A. R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463–5467 (1977).
18. Kabat E. A., Tai Te Wu, M. Reid-Miller, H. M. Perry und K. S. Gottesman, U. S. Dpt of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health (1987).
19. Valentine, R. C. und N. M. Geen, J. M. B. 27, 615–617 (1967).

Patentansprüche

1. Immunglobulin, **dadurch gekennzeichnet**, daß es von Kamelartigen erhältlich ist und daß es zwei schwere Polypeptidketten umfaßt, welche für die Bildung einer vollständigen Antigenbindungsstelle ausreichen, wobei den schweren Polypeptidketten eine sogenannte erste Domäne in ihrem konstanten Bereich (CH1) fehlt, wobei diesem Immunglobulin die leichten Polypeptidketten fehlen.

2. Immunglobulin nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es zwei schwere Polypeptidketten umfaßt, die in der Lage sind, ein oder mehrere Antigene zu erkennen und zu binden, und daß die Aminosäuresequenz seines variablen Bereichs an Position 45 eine Aminosäure enthält, die unter geladenen Aminosäuren ausgewählt ist oder bei der es sich um einen Cysteinrest handelt.

3. Immunglobulin nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es zwei schwere Polypeptidketten umfaßt, die für die Bildung einer vollständigen Antigenbindungsstelle oder mehrerer Antigenbindungsstellen ausreichen, wobei diesem Immunglobulin ferner die leichten Polypeptidketten fehlen und es weiterhin durch die Tatsache gekennzeichnet ist, daß es das Produkt der Expression in einer prokaryotischen oder in einer eukaryotischen Wirtszelle einer DNA oder einer cDNA, die für die Sequenz eines Immunglobulins, welchem die leichten Ketten fehlen, wie diese aus Lymphozyten oder anderen Zellen von Kamelartigen erhältlich sind, codieren, ist.

4. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Antigenbindungsstelle oder mehrere Antigenbindungsstellen umfaßt, und insbesondere, daß die variablen Bereiche der schweren Ketten jeweils wenigstens eine Antigenbindungsstelle enthalten.

5. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Typ-G-Immunglobulin der Klasse 2 (IgG2) oder um ein Typ-G-Immunglobulin der Klasse 3 (IgG3) handelt.

6. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wie es durch Reinigung aus dem Serum von Kamelartigen erhältlich ist, dadurch gekennzeichnet, daß es:

- nicht durch Chromatographie auf einer Protein-G-Sepharosesäule adsorbiert wird,
- durch Chromatographie auf einer Protein-A-Sepharosesäule adsorbiert wird,
- ein Molekulargewicht von ca. 100 kD nach Elution mit einem Puffer mit pH 4,5 (0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure, eingestellt auf pH 4,5 mit NaOH) aufweist,
- aus schweren γ 2-Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kD, vorzugsweise 46 kD, nach Reduktion besteht.

7. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wie es durch Reinigung aus dem Serum von Kamelartigen erhältlich ist, ist dadurch gekennzeichnet, daß das Immunglobulin:

- durch Chromatographie auf einer Protein-A-Sepharosesäule adsorbiert wird,
- ein Molekulargewicht von ca. 100 kD nach Elution mit einem Puffer mit pH 3,5 (0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure) aufweist,
- durch Chromatographie auf einer Protein-G-Sepharosesäule adsorbiert und mit einem Puffer mit pH 3,5 (0,15 M NaCl, 0,58% Essigsäure) eluiert wird,
- aus schweren γ 3-Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kD, insbesondere zwischen 43 und 47 kD nach Reduktion besteht.

8. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es

- in seinem variablen Bereich 4 Gerüstregionen umfaßt, die eine aus der folgenden Gruppe von Sequenzen ausgewählte Aminosäuresequenz umfassen:
für die Domäne der Gerüstregion 1

G G S V Q T G G S L R L S C E I S G L T F D
 G G S V Q T G G S L R L S C A V S G F S F S
 G G S E Q G G G S L R L S C A I S G Y T Y G
 G G S V Q P G G S L T L S C T V S G A T Y S

 G G S V Q A G G S L R L S C T G S G F P Y S
 G G S V Q A G G S L R L S C V A G F G T S
 G G S V Q A G G S L R L S C V S F S P S S

für die Domäne der Gerüstregion 4

W G Q G T Q V T V S S
 W G Q G T L V T V S S
 W G Q G A Q V T V S S
 W G Q G T Q V T A S S
 R G Q G T Q V T V S L

und/oder
für die CDR3-Domäne

A L Q P G G Y C G Y G X - - - - - C L
 V S L M D R I S Q H - - - - - G C
 V P A H L G P G A I L D L K K Y - - - - - K Y
 F C Y S T A G D G G S G E - - - - - M Y
 E L S G G S C E L P L L F - - - - - D Y
 D W K Y W T C G A Q T G G Y F - - - - - G Q
 R L T E M G A C D A R W A T L A T R T F A Y N Y
 Q K K D R T R W A E P R E W - - - - - N N
 G S R F S S P V G S T S R L E S - S D Y - - N Y
 A D P S I Y Y S I L X I E Y - - - - - K Y
 D S P C Y M P T M P A P P I R D S F G W - - D D
 T S S F Y W Y C T T A P Y - - - - - N V
 T E I E W Y G C N L R T T F - - - - - T R
 N Q L A G G W Y L D P N Y W L S V G A Y - - A I
 R L T E M G A C D A R W A T L A T R T F A Y N Y
 D G W T R K E G G I G L P W S V Q C E D G Y N Y
 D S Y P C H L L - - - - - D V

V E Y P I A D M C S - - - - - R Y

und/oder
- daß sein konstanter Bereich C_H2- und C_H3-Domänen umfaßt, welche eine Aminosäuresequenz umfassen, die aus der folgenden Gruppe von Sequenzen ausgewählt ist:
für die C_H2-Domäne:

APELLGGPTVFIFPPKPKDVLSITLTP
APELPGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRP
APELPGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRP
APELLGGPSVVFIFPPKPKDVLSISGRP

für die C_H3-Domäne:

GOTREPQVYTLA
GOTREPQVYTLAPXRLEL
GQPREPQVYTLPPSRDEL
.GQPREPQVYTLPPSREEM
GQPREPQVYTLPPSQEEM

und/oder

– daß seine Gelenkregion 0 bis 50 Aminosäuren umfaßt, insbesondere daß seine Gelenkregion eine Aminosäuresequenz umfaßt, die aus den folgenden Sequenzen ausgewählt ist:

GTNEVCKCPKCP

oder

EPKIPQPPQPKPQPPQPPQPPQPKPQPKPEPECTCPKCP

9. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine unter den in Fig. 7 dargestellten Sequenzen ausgewählte Sequenz codiert wird.

10. Fragment, bei dem es sich um eine schwere Polypeptidkette eines Immunglobulins nach Anspruch 1 handelt, oder Fragment, bei dem es sich um den variablen Bereich einer schweren Kette eines Immunglobulins nach Anspruch 1 handelt, wobei beide Fragmente einen Aminosäurerest in Position 45 der schweren Kette enthalten, bei dem es sich um eine geladene Aminosäure oder einen Cysteinrest handelt, wobei das Fragment eine determinierte Antigenbindungsstelle bildet.

11. Fragment eines Immunglobulins nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

- Fragmente, die durch enzymatischen Verdau der Immunglobuline der Erfindung erhalten werden, bei denen es sich um das FV_{HH}h-Fragment (das die Antigenbindungsstellen der schweren Ketten enthält) oder dessen Dimer F(V_{HH}h)₂ handelt,
- homologe Fragmente, die mit anderen proteolytischen Enzymen erhalten werden.

12. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß sein konstanter Bereich vollständig oder teilweise durch den gesamten konstanten Bereich des menschlichen Antikörpers bzw. einen Teil davon ersetzt ist.

13. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 9, erhältlich in prokaryotischen Zellen, insbesondere in E. coli-Zellen, durch ein Verfahren, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Klonieren in einen Bluecript-Vektor einer DNA- oder cDNA-Sequenz, welche für die V_H-Domäne eines Immunglobulins codiert, dem die leichte Kette fehlt, welche beispielsweise aus Lymphozyten von Kamelartigen erhältlich ist,
- b) Gewinnen des klonierten Fragments nach Amplifizierung unter Verwendung eines 5'-Primers, der eine Xho-Stelle enthält, und eines 3'-Primers, welcher die Spe-Stelle mit der folgenden Sequenz

TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG,

enthält,

- c) Klonieren des gewonnenen Fragments in gleicher Phase in den Immun-PBS-Vektor nach Verdau des Vektors mit Xho- und Spe-Restriktionsenzymen,
- d) Transformieren von Wirtszellen, insbesondere E. coli, durch Tranfektion mit dem rekombinanten Immun-PBS-Vektor aus Schritt c,

e) Gewinnen des Expressionsprodukts der V_{HH} -Codierungssequenz, z. B. indem Antikörper verwendet werden, die gegen die V_{HH} -Domäne eines Dromedars hervorgerufen wurden.

14. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 9, erhältlich in prokaryotischen Zellen durch ein Verfahren, das die folgenden Schritte umfaßt:

a) Klonieren in einen Bluecript-Vektor einer DNA- oder cDNA-Sequenz, welche für die V_H -Domäne eines Immunglobulins codiert, dem die leichte Kette fehlt, welche beispielsweise aus Lymphozyten von Kamelartigen erhältlich ist,

b) Gewinnen des klonierten Fragments nach Amplifizierung unter Verwendung eines 5'-Primers, der eine Xho-Stelle mit einer unter den folgenden gewählten Sequenz:

AG GTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

~~AG CTC CAG CTG CTC GAG TCT GG~~

AG GTC CAG CTT CTC GAG TCT G

enthält,

und eines 3'-Primers, der eine KpnI-Stelle mit der folgenden Sequenz

CGC CAT CAA GGT AAC AGT TGA

enthält

und

c) Klonieren des gewonnenen Fragments in gleicher Phase in den Immun-PBS-Vektor nach Verdau des Vektors mit Xho- und Kpn-Restriktionsenzymen,

d) Transformieren von Wirtszellen, insbesondere E. coli, durch Tranfektion mit dem rekombinanten Immun-PBS-Vektor aus Schritt c,

e) Gewinnen des Expressionsprodukts der V_{HH} -Codierungssequenz, z. B. indem Antikörper verwendet werden, die gegen die V_{HH} -Domäne eines Dromedars hervorgerufen wurden.

15. Heterospezifische Immunglobuline nach einem der Ansprüche 1 bis 9, erhältlich durch ein Verfahren, das die folgenden Schritte umfaßt:

– Erhalten einer ersten DNA- oder cDNA-Sequenz, die für eine V_{HH} -Domäne oder einen Teil davon mit einer determinierten Spezifität gegenüber einem vorgegebenen Antigen codiert und zwischen Xho- und Spe-Stellen liegt,

– Erhalten einer zweiten DNA- oder cDNA-Sequenz, die für eine V_{HH} -Domäne oder einen Teil davon codiert, welche eine determinierte Spezifität aufweist, die von der Spezifität der ersten DNA- oder cDNA-Sequenz verschieden ist und welche zwischen den Spe- und EcoRI-Stellen liegt,

– Verdauen eines Immun-PBS-Vektors mit EcoRI- und XhoI-Restriktionsenzymen,

– Ligieren der erhaltenen DNA- oder cDNA-Sequenzen, die für V_{HH} -Domänen codieren, so daß die DNA- oder cDNA-Sequenzen in Folge in den Vektor kloniert werden,

– Transformieren einer Wirtszelle, insbesondere einer E. coli-Zelle, durch Transfektion und Gewinnen der erhaltenen Immunglobuline.

16. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder 12 bis 13, erhältlich durch ein Verfahren, welches die folgenden Schritte umfaßt:

– Erhalten einer DNA- oder cDNA-Sequenz, die für eine V_{HH} -Domäne oder einen Teil davon codiert, welche eine determinierte spezifische Antigenbindungsstelle aufweist,

– Amplifizieren der erhaltenen DNA- oder cDNA, wobei ein 5'-Primer, der ein Startcodon und eine HindIII-Stelle enthält, und ein 3'-Primer, welcher ein Stoppcodon mit einer XhoI-Stelle enthält, verwendet werden,

– Rekombinieren der amplifizierten DNA- oder cDNA in ein Plasmid,

– Transfizieren permissiver Zellen, insbesondere NB-E-Zellen, mit dem rekombinanten Plasmid,

– Kontrollieren der Expression, beispielsweise über einen ELISA-Test mit gegen einen Bereich einer V_{HH} -Domäne gerichteten Antikörpern, und Gewinnen der erhaltenen Produkte.

17. Immunglobuline nach Anspruch 16, erhältlich durch ein Verfahren, welches die weitere Klonierung einer zweiten DNA- oder cDNA-Sequenz mit einer weiteren determinierten Antigenbindungsstelle in das Plasmid umfaßt.

18. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß es durch ein Verfahren erhältlich ist, wobei es sich bei der transformierten rekombinanten Zelle um eine Hefe, insbesondere S.

cerevisiae, handelt.

19. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß es durch ein Verfahren erhältlich ist, wobei es sich bei dem Vektor um einen für die Expression in Pflanzenzellen geeigneten Vektor und bei den transformierten rekombinanten Zellen um Pflanzenzellen handelt.

20. Immunglobulin oder Fragment nach einem der Ansprüche 16 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß es eine katalytische Aktivität aufweist, insbesondere dadurch, daß es gegen ein Antigen gerichtet ist, welches einen aktivierten Zustand eines gegebenen Substrats nachahmt, wobei diese Immunglobuline beispielsweise in dem Bereich ihrer katalytischen Stelle durch zufällige oder gerichtete Mutagenese modifiziert worden sind.

21. Nukleotidsequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20 in seiner Gesamtheit oder einen Teil davon codiert, wobei die Immunglobuline eine Peptidsequenz umfassen, die ausgewählt ist aus den Folgenden:

VTVSSGTNEVCKCPKCPAPELPGGPSVVFVFP,
 VTVSSEPKIPQPKPQPKPQPKPQPKPEPECTCPKCPAPELLGGPSVFIFP
 GTNEVCKCPKCP
 APELPGGPSVVFVFP
 EPKIPQPKPQPKPQPKPQPKPEPECTCPKCP
 APELLGGPSVFIFP
 APELLGGPTVFIFPPKPKDVLSITLTP
 APELPGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRP
 APELPGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRP
 APELLGGPSVFIFPPKPKDVLSISGRP
 GQTPREPVYTLA
 GQTPREPVYTLAPXRLEL
 GQPREPVYTLPPSRDEL
 GQPREPVYTLPPSREEM
 GQPREPVYTLPPSQEEM
 G G S V Q T G G S L R L S C E I S G L T F D
 G G S V Q T G G S L R L S C A V S G F S F S
 G G S E Q G G G S L R L S C A I S G Y T Y G
 G G S V Q P G G S L T L S C T V S G A T Y S

G G S V Q A G G S L R L S C T G S G F P Y S
 G G S V Q A G G S L R L S C V A G F G T S
 G G S V Q A G G S L R L S C V S F S P S S
 W G Q G T Q V T V S S
 W G Q G A Q V T V S S
 W G Q G T Q V T A S S
 R G Q G T Q V T V S L

und/oder

A L Q P G G Y C G Y G X - - - - - C L
 V S L M D R I S Q H - - - - - G C
 V P A H L G P G A I L D L K K Y - - - - - K Y
 F C Y S T A G D G G S G E - - - - - M Y
 E L S G G S C E L P L L F - - - - - D Y
 D W K Y W T C G A Q T G G Y F - - - - - G Q
 R L T E M G A C D A R W A T L A T R T F A Y N Y
 Q K K D R T R W A E P R E W - - - - - N N
 G S R F S S P V G S T S R L E S - S D Y - - N Y
 A D P S I Y Y S I L X I E Y - - - - - K Y
 D S P C Y M P T M P A P P I R D S F G W - - D D
 T S S F Y W Y C T T A P Y - - - - - N V
 T E I E W Y G C N L R T T F - - - - - T R
 N Q L A G G W Y L D P N Y W L S V G A Y - - A I
 R L T E M G A C D A R W A T L A T R T F A Y N Y
 D G W T R K E G G I G L P W S V Q C E D G Y N Y
 D S Y P C H L L - - - - - D V
 V E Y P I A D M C S - - - - - R Y

22. Nukleotidsequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20 codiert, dadurch, daß sie eine aus den in Fig. 7 dargestellten Sequenzen ausgewählte Sequenz umfaßt.

23. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 20, welcher gegen ein determiniertes Antigen gerichtet ist, wobei die Antigenbindungsstelle des Antikörpers aus schweren Polypeptidketten besteht und wobei dem Antikörper weiterhin die leichten Polypeptidketten fehlen, wobei das Verfahren umfaßt:

- Immortalisieren von Lymphozyten, die beispielsweise aus dem peripheren Blut von Kamelartigen, die vorher mit einem determinierten Antigen immunisiert wurden, erhalten wurden, mit einer unsterblichen Zelle und vorzugsweise mit Myelomzellen, um ein Hybridom zu bilden,
- Kultivieren der gebildeten immortalisierten Zellen und Gewinnen der Zellen, welche die Antikörper mit der gewünschten Spezifität produzieren.

24. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, welche gegen determinierte Antigene gerichtet sind, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- Klonieren in Vektoren, insbesondere in Phagen und besonders bevorzugt filamentösen Bakteriophagen, einer DNA- oder cDNA-Sequenz, die aus Lymphozyten von Kamelartigen erhalten wurde, die vorher mit determinierten Antigenen immunisiert wurden, welche ein Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20 produzieren können,
- Transformieren von prokaryotischen Zellen mit den obigen Vektoren unter Bedingungen, welche die Produktion der Antikörper erlauben,
- Selektieren des entsprechenden Antikörpers, indem die transformierten Zellen einer Antigen-Affinitätsselektion unterworfen werden,
- Gewinnen der Antikörper mit der gewünschten Spezifität.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei es sich bei dem Klonierungsvektor um ein Plasmid oder ein eukaryotisches Virus und bei der transformierten Zelle um eine eukaryotische Zelle, insbesondere eine Hefezelle, Säugetierzelle, Pflanzenzelle oder Protozoenzelle handelt.

26. Verfahren nach Anspruch 24, wobei es sich bei dem Klonierungsvektor um ein Plasmid handelt, mit dem das Immunglobulin in der Bakterienmembran exprimiert werden kann.

27. Verfahren nach Anspruch 24, wobei es sich bei dem Klonierungsvektor um ein Plasmid handelt, mit dem das Immunglobulin als Sekretionsprotein exprimiert werden kann.

28. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß es gegen ein Antigen, wie beispielsweise dem eines Bakteriums, eines Virus, eines Parasiten, oder gegen ein Protein, Hapten, Kohlenhydrat oder eine Nukleinsäure gerichtet ist.

29. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß es gegen einen Immunglobulin-Idiotyp gerichtet ist.

30. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß es gegen ein zelluläres Rezeptor- oder Membranprotein gerichtet ist.

31. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß es eine katalytische Aktivität aufweist.

32. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20 oder ein Fragment nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem Toxin konjugiert ist.

33. Immunglobulin nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen heterospezifischen Antikörper handelt.

34. Rekombinanter Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 21 oder Anspruch 22 umfaßt und daß es sich dabei um ein Plasmid, einen Phagen, insbesondere einen Bakteriophagen, ein Virus, ein YAC, ein Cosmid handelt.

35. Rekombinante Zelle oder nichtmenschlicher Organismus, dadurch gekennzeichnet, daß sie bzw. er durch einen Vektor nach Anspruch 34 modifiziert ist.

36. cDNA-Bibliothek, welche aus Nukleotidsequenzen zusammengesetzt ist, die für ein Immunglobulin aus schweren Ketten nach einem der Ansprüche 1 bis 20 codieren, wie sie beispielsweise durch ein Durchführen

der folgenden Schritte erhalten wird:

- a) Behandeln einer Probe, die lymphoide Zellen, insbesondere periphere Lymphozyten, Milzzellen, Lymphknoten oder ein anderes Lymphgewebe aus einem gesunden Tier, das insbesondere ausgewählt wird aus den Kamelartigen, enthält, um die B-Lymphozyten abzutrennen,
- b) Abtrennen polyadenylierter RNA von den anderen Nukleinsäuren und Bestandteilen der Zellen,
- c) Umsetzen der erhaltenen RNA mit einer reversen Transkriptase, um die entsprechende cDNA zu erhalten,
- d) Inkontaktbringen der erhaltenen cDNA mit 5'-Primern, welche der V_H -Domäne von Immunglobulinen mit vier Ketten aus Mäusen entsprechen, wobei der Primer eine festgelegte Restriktionsstelle, z. B. eine XhoI-Stelle, enthält, und mit 3'-Primern, welche dem N-terminalen Teil einer C_H2 -Domäne entsprechen,
- e) Amplifizieren der DNA,
- f) Klonieren der amplifizierten Sequenz in einen Vektor, insbesondere in einen Bluescript-Vektor,
- g) Gewinnen der Klone, die mit einer Sonde hybridisieren, welche der Sequenz entspricht, die für eine konstante Domäne aus einem isolierten Immunglobulin aus schweren Ketten codiert.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

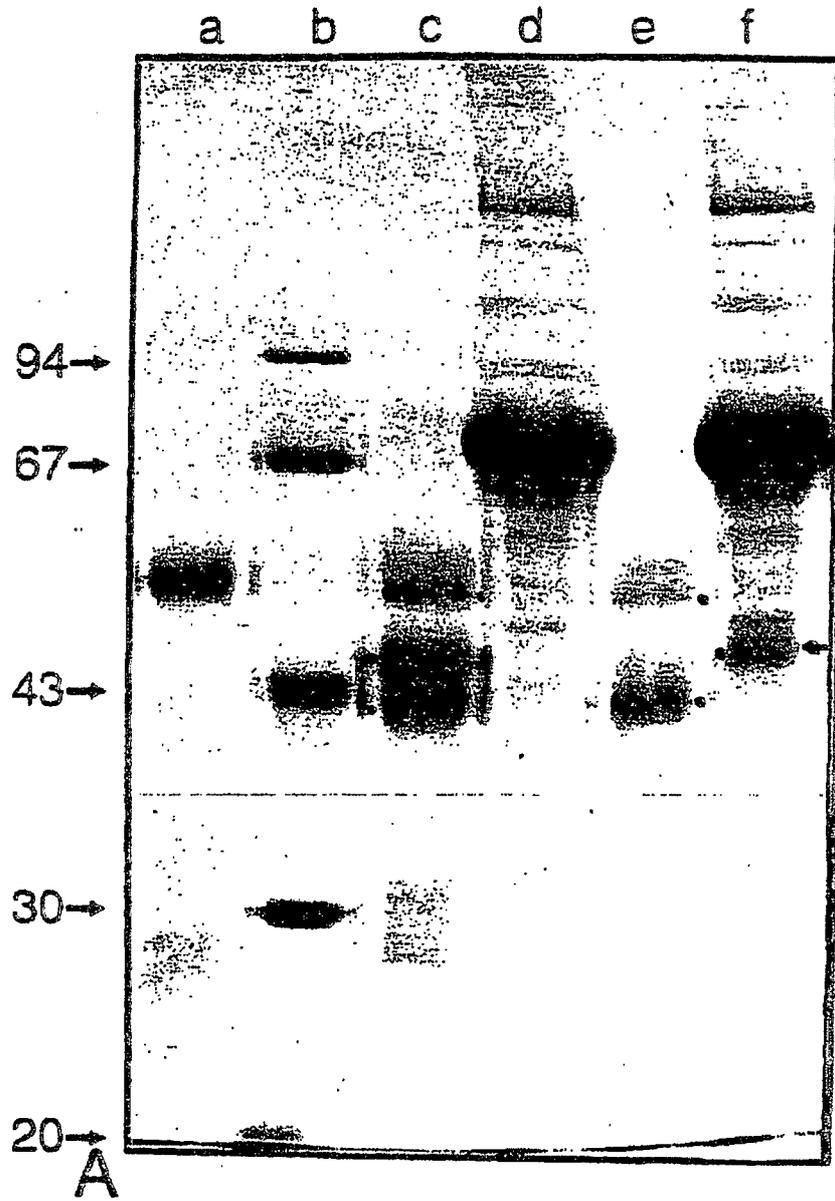


FIGURE 1A

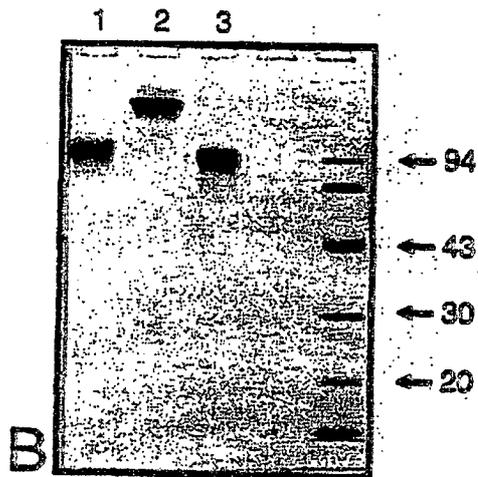


FIGURE 1B

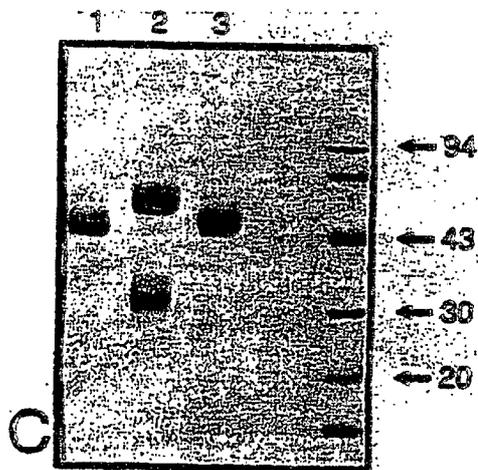
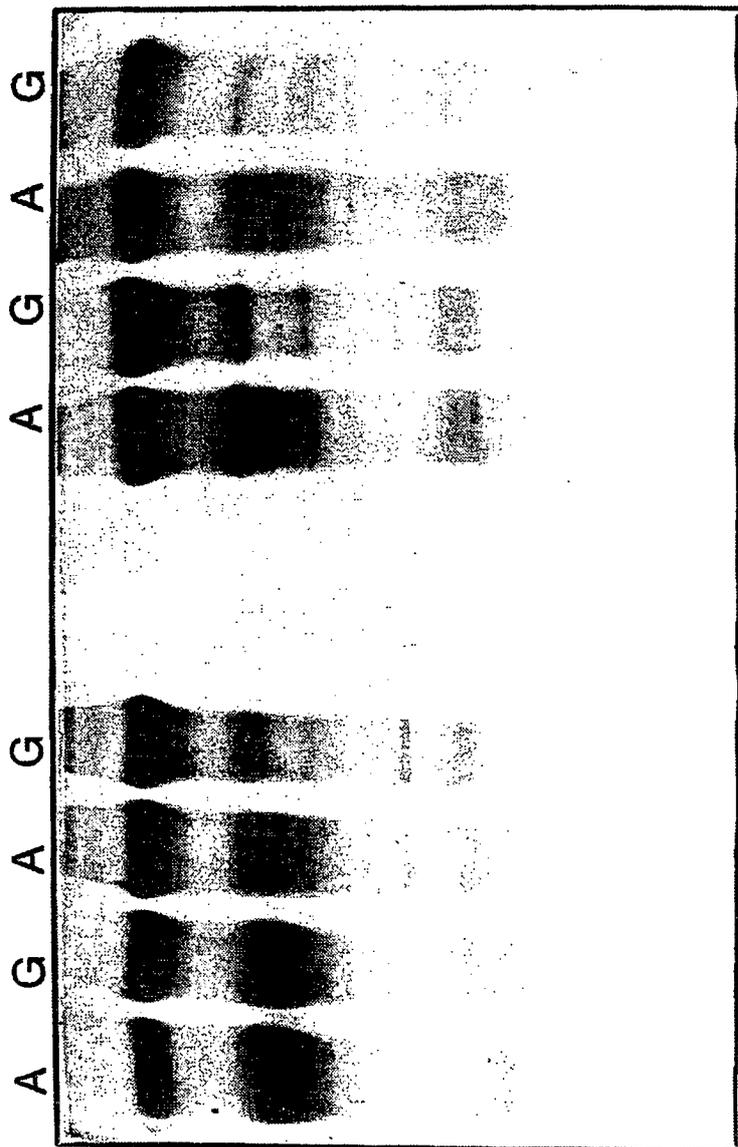
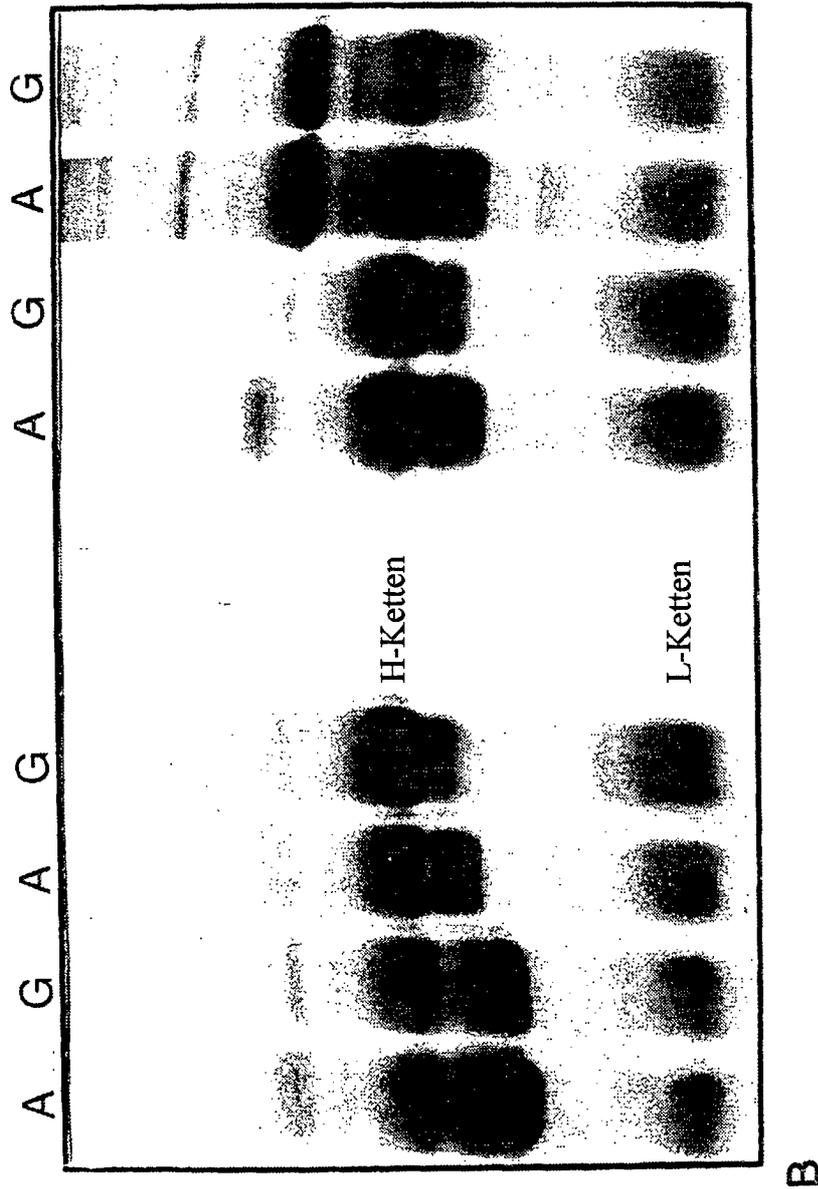


FIGURE 1C

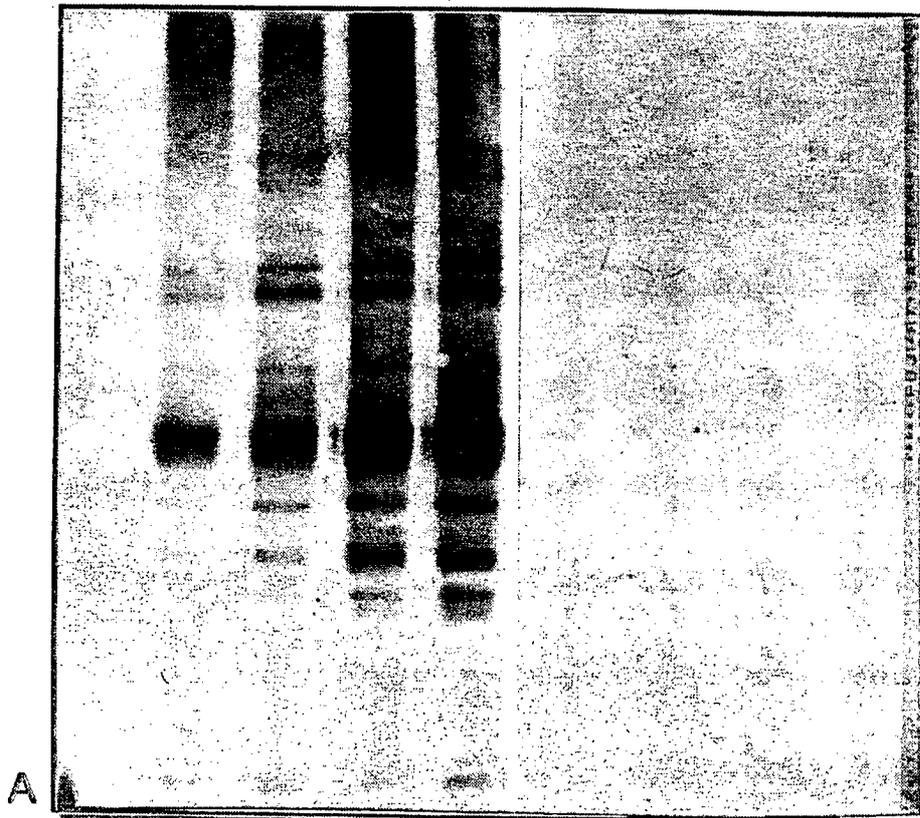


A

FIGUR 2A

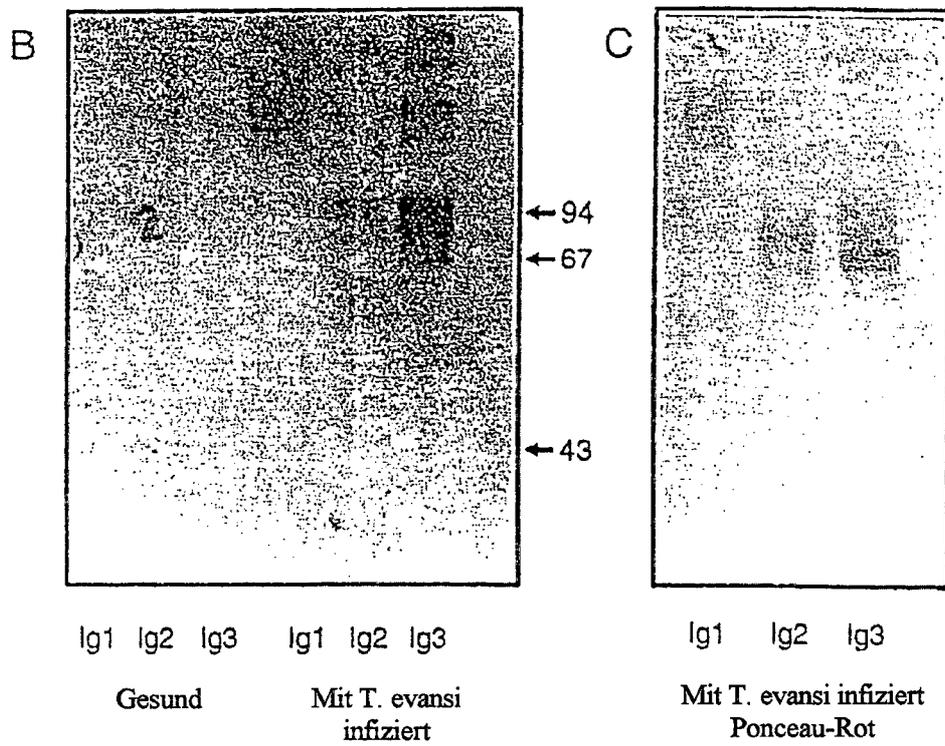


FIGUR 2B



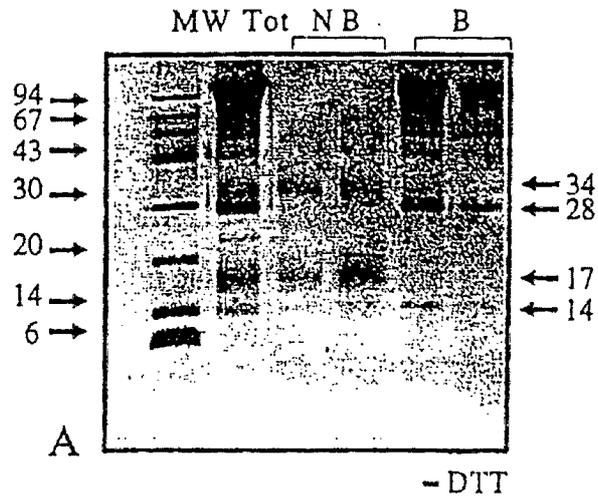
	Prot. A	Ig1	Ig2	Ig3	Tot.Ser	Ig1	Ig2	Ig3	Tot.Ser	
	Kontrolle				Mit T. evansi infiziert				Gesund	
Zählimpulse/5 μ l	65	1258	1214	2700	2978	147	157	160	107	

FIGUR 3A

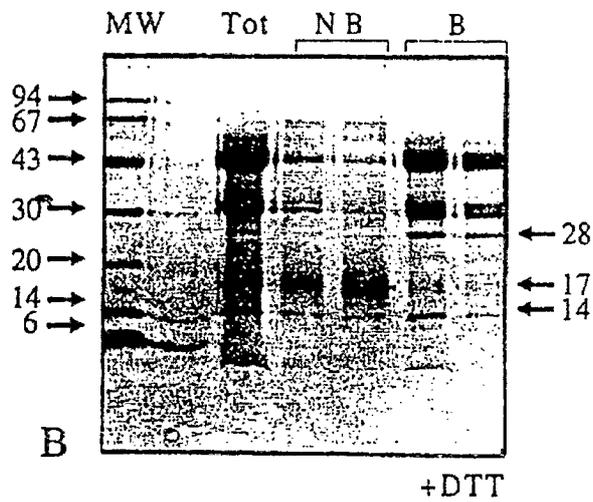


FIGUR 3B

FIGUR 3C



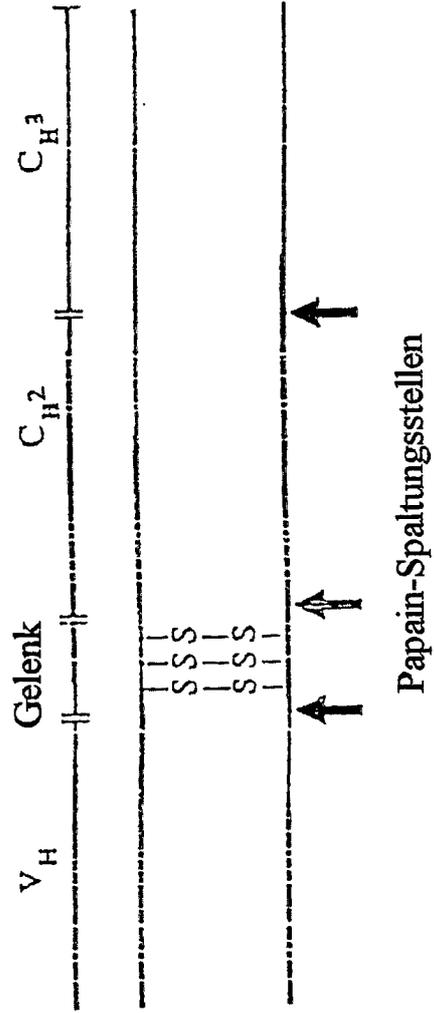
FIGUR 4A



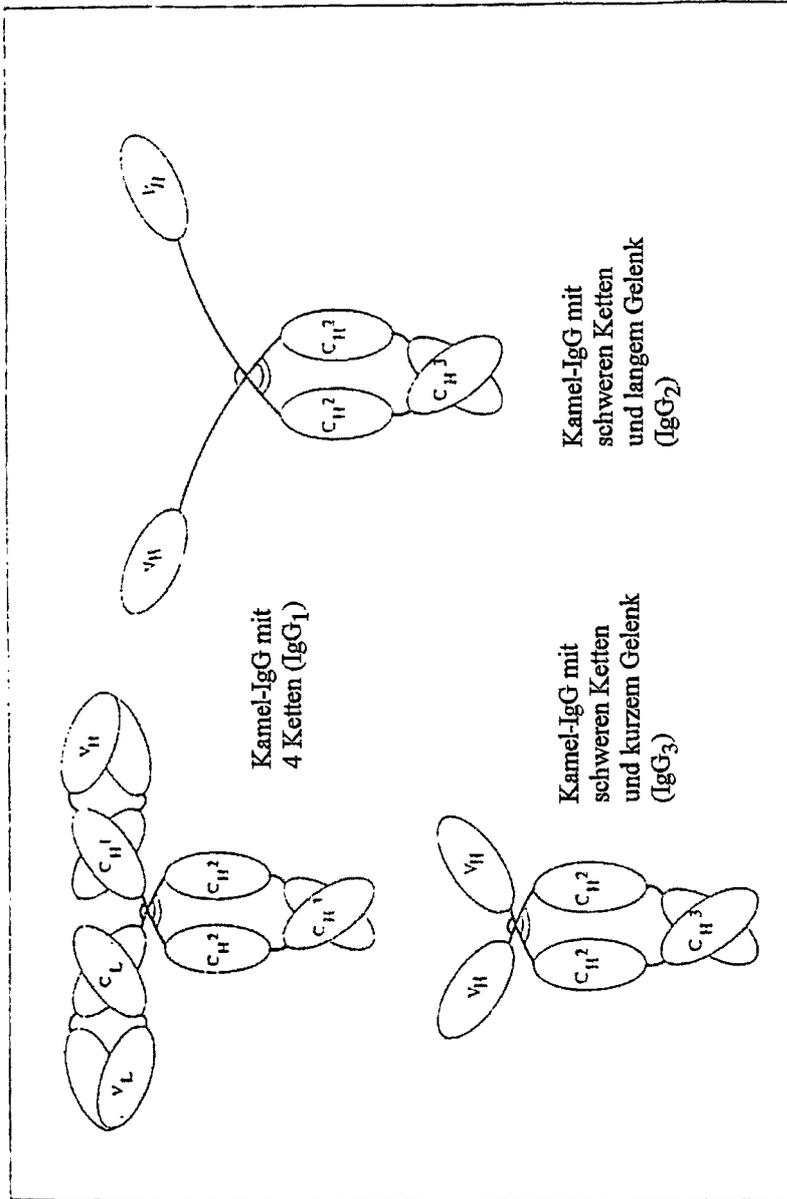
FIGUR 4B

Analyse der IgG₃-Papainfragmente durch SDS-PAGE

Modell für IgG₃ des Kamels



Figur 5: Schematische Darstellung des Modells von Kamel-IgG₃



Figur 6: Eine schematische Darstellung der Kamel-Immunglobuline IgG₁, der mutmaßlichen IgG₂ und IgG₃. Das große (Pro-X)₁₂ des mutmaßlichen IgG₂-Moleküls kann als eine Wiederholung von 6 Aminosäuren modelliert werden.

DR01006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR27006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR03006 C-----AGGTGA-----AACTGCTCGAG---TCTGGAGGAGG
 DR11006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR24006 C-----AGGTGA-----AACTGCTCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR16006 C-----TCGAG---TCTGGAGGAGG
 DR19006 C-----TCGAG---TCTGGAGGAGG
 DR07006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR16006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR20006 C-----TCGAG---TCAGGGGGAGG
 DR25006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR20006 C-----TCGAG---TCTGGAGGAGG
 DR21006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR09006 C-----AGGTGA-----AACTGCTCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR17006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR13006 C-----TCGAG---TCAGGGGGAGG
 DR02006 CTCGAGTCAGGTGTCCGGTCTGATGTGCAGCTGGTGGCGTCTGGGGGAGG

DR01006 ATCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTC--GTGCG-CAGCCTCTG
 DR27006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCATCTTCTTCTA
 DR03006 CTCGGTGCAGACTGGAGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGT--C-TCTG
 DR11006 GTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAATGT--C-TCTG
 DR24006 GTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAATGT--C-TCTG
 DR16006 CTCGGCGCAGGCTGGAGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC--CCACGG
 DR19006 CTCGGTTCAGGCTGGAGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGC--C-TCTG
 DR07006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAA---TCTCTG
 DR16006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAG---GCTCTG
 DR20006 CTCGGTACAGGTTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAG---CCTCTA
 DR25006 CTCGGTACAAGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTTGGC---AAATCTCTG
 DR20006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG---TAGCCTCTG
 DR21006 CTCGGTGCAGGTTGGAGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTAAAAT---CTCTG
 DR09006 CTCGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGACACTCTCTTGTG---TATACAC--
 DR17006 CTCGGTCCAACCTGGAGGATCTCTGACACTCTCCTGTACAGTT---TCTG
 DR13006 CTCGGTGGAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAG---CCTCTG
 DR02006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAG---CCTCTG

DR01006 GA--TACAGTAATT---GTCCCCTCACTTG-GAGCTGGTATCGCCAGTTT
 DR27006 AA--TATATGCCTT---GCACCTACGACAT-GACCTGGTACCGCCAGGCT
 DR03006 GA--TTCTCCTTTA---GTACCAGTTGTAT-GGCCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR11006 GC--TCTCCCAGTA---GTACTTATTGCCT-GGGCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR24006 GC--TCTCCCAGTA---GTACTTATTGCCT-GGGCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR16006 GA--TTCCGC-TCA---ATGGTTACTACAT-CGCCTGGTTCCGTCAGGCT
 DR19006 AC--TACACCATCA---CTGATTATTGCAT-GGCCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR07006 GA--TACACGTACG---GTAGCTTCTGTAT-GGGCTGGTTCCGCCAGGGT
 DR16006 GA--TTCCCCTATA---GTACCTTCTGTCT-GGGGTGGTTCCGCCAGGCT
 DR20006 CT--CACACCGACA---GTAGCACCTGTAT-AGGCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR25006 GA--TTGACTTTTG---ATGATTCTGACGT-GGGGTGGTACCGCCAGGCT
 DR20006 GA--TTCAATTTTCG---AAACTTCTCGTAT-GGCGTGGTACCGCCAGACT
 DR21006 GAGGTACCCAGATCGTGTTCCTAAATCTTTGGCCTGGTTCCGCCAGGCT

FIGUR 7(1)

DR09006 -----CAACGATACTGGGACCA-----TGGGATGGTTTCGCCAGGCT
 DR17006 --GGCCACCTACA---GTGACTACAGTATTGGA-TGGATCCGCCAGGCT
 DR13006 G-----ATACGTAT-CCT----CTATGGCCTGGTTCCGCCAGGTT
 DR02006 GAG?----CAGTTTCAGTAGATT--TGCCATGTCTTGGTTCCGCCAGGCT

DR01006 CCAGGAACGGAGCGCGAGTTCGTCTCCAGTATGGATCCGGATGGAAATAC
 DR27006 CCAGGCAAGGAGCGCGAATTGTCTCAAGTATAAATATTGATGGTAAGAC
 DR03006 TCAGGAAAGCAGCGTGAGGGGGTCGCAGCCATTAATAGTGGCGGTGGTAG
 DR11006 CCAGGGAGGGAGCGTGAGGGGGTCACAGCGATTAA-----CACTGATGG
 DR24006 CCAGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTCACAGCGATTAA-----CACTGATGG
 DR16006 CCTGGGAAGGGCGTGAGGGGGTCGCAACAATTAATGGTGGTTCG-----
 DR19006 CCAGGGAAGGAGCGTGAAATTGGTCGCAGCGATTCAAGTTGTCCGTAGTGA
 DR07006 CCAGGCAAGGAACGTGAGGGGATCGCAACTATTCTTAATGGTGGTACTAA
 DR16006 CCAGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTCGCGGGTATTAATAGTGCAGGAGGTAA
 DR20006 CCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTCGCAAGTATATATTTTGGTGTGGTGG
 DR25006 CCAGGGGATCAGTGCAAATTGGTCTCAGGTATTCTGAGTGTGGTACT-C
 DR20006 CCAGGAAATGTGTGTGAGTTGGTCTCAAGTATTTACAGTGTGG-----
 DR21006 CCAGAGAAGGAGCGCGAGGGGATCGCAGTCTTTTCGACTAAGGATGGTAA
 DR09006 CCAGGGAAGAGTGCAGAAAGGGTCGCGCATATTACGCCTGATGGTATGA-
 DR17006 CCAGGGAAGGACCGTGAAGTAGTCCGACCCGCTAATACTGGTG-----
 DR13006 CCAGGGCAGGAGCGCGAGGGGGTCGCGTTTGTTCAAACGG-----
 DR02006 CCAGGGAAGGAGTGCAGAAATTGGTCTCAAGCATTCAAAGTAATGGAAGGAC

DR01006 CAAGTACA-----CATACTCCGTGAAGGGCCCGTTCCACC
 DR27006 AACATACG-----CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR03006 GACATACTA-CAACACATATGTCGCCGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCCGCC
 DR11006 CAGTATCAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR24006 CAGTGTAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR16006 -----CGA-CGTACATACTACGCCGACTCCGTGACGGGCCGATTCCACC
 DR19006 TACT--CGC-C-TCACAGACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR07006 -----CACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR16006 -----TACTTACTATGCCGACGCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR20006 -----TACGAATTATCGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR25006 CATATACAAAGAGTGGAGACTATGCTGAGTCTGTGAGGGGGCCGGTTACC
 DR20006 CA-AAACATACTACGTCGACC--GCA-----TGAAGGGCCGATTCCACC
 DR21006 GA-----CATTCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR09006 -----CCTTCATTGATGAACCCGTGAAGGGCCGATTCCAG
 DR17006 -----CGACTAGTAAATTCTACGTCGACTTTGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR13006 --CTGACAAT-AGTGCATTATATGGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
 DR02006 AACTGA-----GGCCGATTCCGTGCAAGGGCCGATTCCACC

DR01006 ATGTCCCGAGGCAGCACCGAGTACACAGTATTTCTGCAATGGACAATCT
 DR27006 ATCTCCCAAGACAGCGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCT
 DR03006 ATCTCCCAAGACAACGCCAAGACCACGGTATATCTTGATATGAACAACCT
 DR11006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGGAAACGGTACATCTCCAGATGAACAACCT
 DR24006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGAAAACGGTATATCTCCAGATGAACAACCT
 DR16006 ATCTCCCGAGACAGCCCCAAGAATACGGTGTATCTGCAGATGAACAACCT
 DR19006 ATCTCCCAAGGCAACACCAAGAACACAGTGAATCTGCAATGAACAACCT
 DR07006 ATCTCCCAAGACAGCACGTTGAAGACGATGTATCTGCTAATGAACAACCT
 DR16006 ATCTCCCAAGGGAATGCCAAGAATACGGTGTTCCTGCAATGGATAACTT
 DR20006 ATCTCCCAACTCAACGCCAGAACACAGTGTATCTGCAATGAACAACCT
 DR25006 ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATGATATACCTTCAAATGAACAACCT
 DR20006 ATTTCTAGAGAGAATGCCAAGAATACATTGTATCTACAACCTGAGCGGCT
 DR21006 ATCTTCTTAGATAATGACAAGACCACTTCTCCCTACAACCTGATCGACT
 DR09006 ATCTCCCGAGACAACGCCAGAAAACGTTGTCTTTCGCAATGAATAGTCT

FIGUR 7(2)

```

DR17006 ATTTCCCAAGACAACGCCAAGAATACGGTATATCTGCAAATGAGCTTCCT
DR13006 ATCTCCCACGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGCGCAACCT
DR02006 ATCTCCCAGACAATTCAGGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCT

DR01006 GAAACCTGAGGACACGGCGATGTATTACTGTAAAAC-A---GCCCTAC--
DR27006 GAAACCTGAGGACACGGCGATGTATTACTGTAAAAT-A---GA--TTC--
DR03006 AACCCCTGAAGACACGGCTACGTATTACTGTGCGGCGG---TCCCAGCCC
DR11006 GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACTGCGCGGCAA---GACTGACGG
DR24006 GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACTGCGCGGCAA---GACTGACGG
DR16006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTACTTCTGTGCAGCAG---G-----CTC
DR19006 GACACCTGAGGACACGGCCATCTACAGTTGTGCGGCAA---C-----CAG
DR07006 GAAACCTGAAGACACGGGCACCTATTACTGTGCTG-CA---GAACTAAGT
DR16006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGCGCGG-CG---GATAGTCCA
DR20006 GAAACCTGAGGACACGGCCATGTACTACTGTGCAATCA---CTGAAATTG
DR25006 GAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGCGCGGTAGATGGTTGGACCC
DR20006 CAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCG-----C-----CC
DR21006 GAACCCGGAGGACACTGCCGACTACTACTGCGCTGCAAATCAATTAGC--
DR09006 GAGGCCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCAGATTG-----
DR17006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGTGCGGCAG-----CGGACCC
DR13006 GCAACCTGACGACACTGGCGTGTACTACTGTGCGGC-----CAA
DR02006 GAAACCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGGGCAGT-----

DR01006 -----A-AC--CTGGGGGTTATTGTGGGTA-
DR27006 -----GTAC--CCGTGCCATCTCCTTGATG-
DR03006 ACTTGGGACCT-----GGCG-CCATT-----CTTGATTG
DR11006 AGATGGGGGCTTGTGATGCGAGATGGGCGACCTTAGC--GACAAGGAC-G
DR24006 AGATGGGGGCTTGTGATGCGAGATGGGCGACCTTAGC--GACAAGGAC-G
DR16006 GCGTTTTT-CTAGTCCGTGGGAGCACTTC-TAGAC---TCGAAAGTAG
DR19006 TAGTTTTTACTGGTACT-----GCAC-----C---ACG-----G
DR07006 GGTGGTAGTTGTGAATTGC---CTTTGC-----TATTTGACTA-----
DR16006 TGTTACATGCCGACTATGC---CCGCTCCCCGATACGAGACAGTTTTGG
DR20006 AGTGGTATGGGTGCAATT---AAGGACTACTTTTACT---C-----G
DR25006 GGAAGGAAG--GGGGAATCGGGTTAC----CCTGGTCGGTCCAATGTGAA
DR20006 GGTGAA-----TATC---CTATTGCAGAC--ATGTGTT
DR21006 ---TGGTGGCTGGTATT-----TGGACCCGAATTACTGG-CTCTCTGTG
DR09006 ---GAAATACTGGA---CTTGTGGTGC--CCAGA-CTGG-----AG
DR17006 AAGTATATATTATAGTATC-----CTCCNNAT-----
DR13006 AAGAAGGATCGTA-----CTAGATGGGC-----CGAGCCT-----
DR02006 -----CTCCCTAA--TGGACCGAATTTCT

DR01006 --TGGGTANTGCCTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR27006 --T-----CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR03006 AAAAAGTATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR11006 TTTGCGTATAACTACTGGGGCCGGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR24006 TTTGCGTATAACTACTGGGGCCGGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR16006 CGA-CT-ATAACTATTGGGGCCAGGGGATCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR19006 CGC-CTTATAACGTCTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR07006 CTGGG-----GCCAGGGCACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR16006 CTGGGATGATTTT-----GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR20006 CTGGG-----GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR25006 GATGGTTATAACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
DR20006 CGAGAT----ACG---GCGACCCGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
DR21006 GGTGCATATGCCATCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
DR09006 GATACTTCGGACAG-TGGGGTCAGGGGGCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR17006 --TGAGTATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA--

```

FIGUR 7(3)

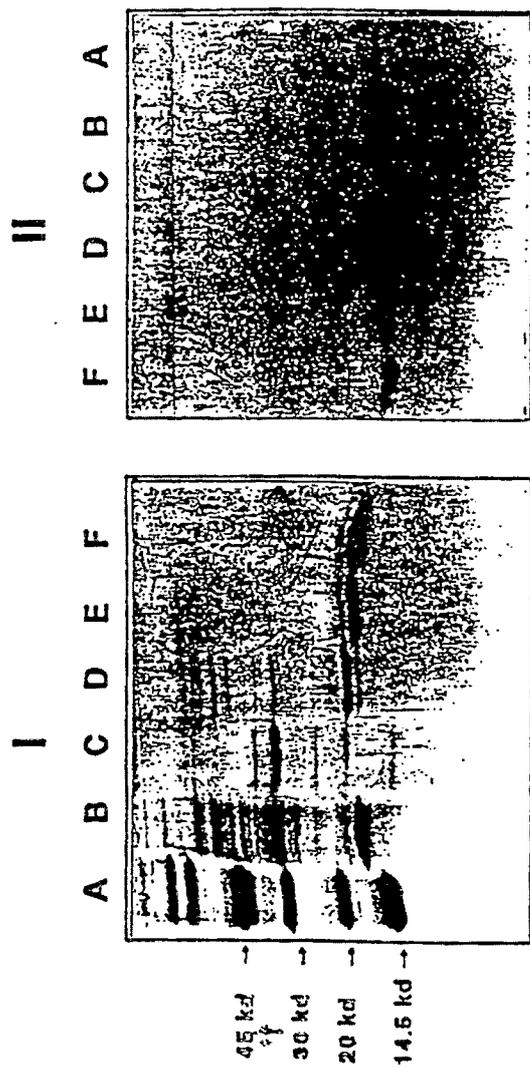
```

DR13006 CGAGAATGGAACAAC TGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA--
DR02006 CCAACATGGG--TGCCGGGGCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCCT----

DR01006 AG----TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR27006 AG----TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR03006 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR11006 AG----TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR24006 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR16006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR19006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR07006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR16006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR20006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR25006 ---TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR20006 ---TAGTTACCCGTACGACGAACCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR21006 ---TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR090J6 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTC TTAATAGAATTC
DR17006 -----
DR13006 -----
DR02006 -----TA

```

FIGUR 7(4)



Figur 8