



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 338 791**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **05008358 .3**
⑨6 Fecha de presentación : **18.08.1993**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1589107**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

⑤4 Título: **Inmunoglobulinas desprovistas de cadenas ligeras.**

③0 Prioridad: **21.08.1992 EP 92402326**
21.05.1993 EP 93401310

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2010

⑦3 Titular/es: **Vrije Universiteit Brussel**
Pleinlaan 2
1050 Brussel, BE

⑦2 Inventor/es: **Casterman, Cécile y**
Hamers, Raymond

⑦4 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoglobulinas desprovistas de cadenas ligeras.

5 La invención se refiere a nuevas inmunoglobulinas aisladas que están desprovistas de cadenas polipeptídicas ligeras. Estas inmunoglobulinas no consisten en los productos de degradación de las inmunoglobulinas compuestas tanto de cadenas polipeptídicas pesadas como de cadenas polipeptídicas ligeras, sino que por el contrario, la invención define un nuevo miembro de la familia de las inmunoglobulinas, especialmente un nuevo tipo de moléculas capaces de estar implicadas en el reconocimiento inmune. Tales inmunoglobulinas pueden usarse para varios propósitos, especialmente para propósitos de diagnóstico o terapéuticos, incluyendo la protección frente a los agentes patológicos o la regulación de la expresión o la actividad de las proteínas.

15 Hasta ahora, la estructura propuesta para las inmunoglobulinas consiste en un modelo de cuatro cadenas que se refiere a la presencia de dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (cadenas ligeras) y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (cadenas pesadas) unidas mediante puentes disulfuro para formar macromoléculas con forma de Y o de T. Estas cadenas están compuestas por una región constante y una región variable, estando la región constante subdividida en varios dominios. Las dos cadenas polipeptídicas pesadas se unen normalmente mediante puentes disulfuro en una denominada "región bisagra" situada entre el primer y segundo dominios de la región constante.

20 Entre las proteínas que forman la clase de las inmunoglobulinas, la mayoría de ellas son anticuerpos y en consecuencia, presentan un sitio de unión al antígeno o varios sitios de unión al antígeno.

25 Según el modelo de cuatro cadenas, el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo se localiza en los dominios variables de cada una de las cadenas pesada y ligera y requiere la asociación de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera.

30 Para la definición de estas inmunoglobulinas de modelo de cuatro cadenas, se hace referencia a Roitt. 1 *et al.* (Immunology-second-Edition Gower Medical Publishing USA, 1989). La referencia se hace especialmente a la parte concerniente a la definición de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas, a sus estructuras polipeptídicas y genéticas, a la definición de sus regiones variables y constantes y a la obtención de los fragmentos producidos por la degradación enzimática según técnicas bien conocidas.

35 Los inventores han establecido sorprendentemente que pueden aislarse moléculas diferentes a partir de animales que las producen naturalmente, moléculas que tienen propiedades funcionales de inmunoglobulinas, estando esas funciones relacionadas en algunos casos con elementos estructurales que son distintos de los implicados en la función de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas debido, por ejemplo, a la ausencia de cadenas ligeras.

40 La invención se refiere a inmunoglobulinas del modelo de dos cadenas que no corresponden ni con los fragmentos obtenidos por ejemplo mediante la degradación, en particular la degradación enzimática, de una inmunoglobulina del modelo de cuatro cadenas, ni corresponde con la expresión en las células huésped del ADN que codifica para la región constante o la variable de una inmunoglobulina natural del modelo de cuatro cadenas o con una parte de estas regiones, ni corresponde con los anticuerpos producidos en las linfopatías, por ejemplo, en ratones, ratones, ratas o humanos.

45 E.S. Ward *et al.* (1) ha descrito algunos experimentos realizados en los dominios variables de las cadenas polipeptídicas pesadas (V_H) o/y en las cadenas polipeptídicas ligeras (V_K/F_v) para probar la capacidad de estos dominios variables para unir antígenos específicos. Para este propósito, se preparó una librería de genes V_H a partir del ADN genómico del bazo del ratón inmunizado previamente con estos antígenos específicos.

50 Ward *et al* han descrito en su publicación que los dominios V_H son relativamente adhesivos, presumiblemente debido a la superficie hidrófoba expuesta, normalmente tapada por los dominios V_K o V_L . Por consiguiente, ellos se imaginaron que debería ser posible diseñar dominios V_H que tuvieran propiedades mejoradas y además, que los dominios V_H con actividades de unión pudieran servir como los componentes básicos para fabricar fragmentos variables (fragmentos F_v .) o anticuerpos completos.

55 La publicación de Blier P.R. *et al* (The Journal of Immunology, vol. 139, 3996-4006, n° 12, 15 de diciembre de 1987) describe secuencias de nucleótidos incompletas obtenidas a partir de hibridomas.

60 La invención no parte de la idea de que los diferentes fragmentos (cadenas ligeras y pesadas) y los diferentes dominios de estos fragmentos de la inmunoglobulina del modelo de cuatro cadenas pueda modificarse para definir sitios de unión al antígeno nuevos o mejorados o una inmunoglobulina del modelo de cuatro cadenas.

65 Los inventores han determinado que las inmunoglobulinas pueden tener una estructura diferente al modelo conocido de cuatro cadenas y que tales inmunoglobulinas diferentes ofrecen nuevos medios para la preparación de reactivos de diagnóstico, agentes terapéuticos o cualquier otro reactivo para su uso en investigación o para propósitos industriales.

Por tanto, la solicitud describe nuevas inmunoglobulinas que son capaces de mostrar propiedades funcionales de las inmunoglobulinas del modelo de cuatro cadenas, aunque su estructura parezca ser más apropiada en muchas cir-

constancias para su uso, su preparación y en algunos casos, para su modificación. Además, estas moléculas pueden considerarse como estructuras principales para la modificación de otras inmunoglobulinas. Las ventajas proporcionadas por estas inmunoglobulinas comprenden la posibilidad de prepararlas con una mayor facilidad.

5 De acuerdo con esto, la invención describe inmunoglobulinas caracterizadas porque comprenden dos cadenas polipeptídicas pesadas suficientes para la formación de un sitio completo de unión al antígeno o de varios sitios de unión al antígeno, estando además estas inmunoglobulinas desprovistas de cadenas polipeptídicas ligeras. Estas inmunoglobulinas se caracterizan además por el hecho de que son el producto de la expresión en una célula huésped procariótica o eucariótica, de un ADN o de un ADNc que tiene la secuencia de una inmunoglobulina desprovista de
10 cadenas ligeras, obtenible a partir de linfocitos o de otras células de camélidos.

Las inmunoglobulinas descritas pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de las secuencias que se describen en la figura 7.

15 Las inmunoglobulinas descritas, que están desprovistas de cadenas ligeras, están de manera que los dominios variables de sus cadenas pesadas tengan propiedades que difieren de las de los VH de la inmunoglobulina de cuatro cadenas. El dominio variable de una inmunoglobulina de cadena pesada de la invención no tiene sitios de interacción normales con el dominio V_L, ni con el C_H1 que no existe en las inmunoglobulinas de cadena pesada. Por lo tanto, es un fragmento novedoso en muchas de sus propiedades, tal como la solubilidad y la posición del sitio de unión. Por
20 razones de claridad, lo llamaremos VHH en este texto para distinguirlo de los VH clásicos de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas.

Por "un sitio de unión al antígeno completo" se quiere decir, de acuerdo con la invención, un sitio que permitirá por sí solo el reconocimiento y la unión completa de un antígeno. Esto podría verificarse mediante cualquier método conocido con respecto a los ensayos de la afinidad de la unión.

Estas inmunoglobulinas que pueden ser preparadas mediante la técnica de ADN recombinante, o aisladas de animales, algunas veces serán denominadas "inmunoglobulinas de cadenas pesadas" en las siguientes páginas. Preferiblemente estas inmunoglobulinas están en una forma pura.

30 Las inmunoglobulinas descritas son obtenidas en células procarióticas, especialmente en células de *E. coli* por un proceso que comprende los pasos de:

- 35 a) clonar en un vector Bluescript una secuencia de ADN o ADNc que codifica para el dominio V_{HH} de una inmunoglobulina desprovista de cadena ligera obtenida por ejemplo a partir de linfocitos o Camellos,
- b) recuperar el fragmento clonado después de la amplificación usando un cebador 5' que contiene un sitio Xho y un cebador 3' que contiene el sitio Spe que tiene la siguiente secuencia
40 TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG,
- c) clonar el fragmento recuperado en fase en el vector inmuno PBS después de la digestión del vector con las enzimas de restricción Xho y Spe,
- 45 d) transformar las células hospederas, especialmente de *E. coli* por transfección con el vector inmuno PBS recombinante del paso c;
- e) recuperar el producto de expresión de la secuencia de codificación de V_{HH}, por ejemplo usando anticuerpos cultivados contra el dominio V_{HH} del dromedario.

50

La solicitud describe inmunoglobulinas que son inmunoglobulinas heteroespecíficas obtenidas por un proceso que comprende los pasos de:

- 55 - obtener una primera secuencia de ADN o ADNc que codifica para un dominio V_{HH} o parte del mismo que tiene una especificidad determinada contra un antígeno dado y comprendido entre los sitios Xho y Spe,
- obtener una segunda secuencia de ADN o ADNc que codifica para un dominio V_{HH} o parte del mismo, que tiene una especificidad determinada diferente de la especificidad de la primera secuencia de ADN o ADNc y comprendida
60 entre los sitios Spe y EcoRI,
- digerir un vector inmuno PBS con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI,
- ligar las secuencias obtenidas de ADN o de ADNc que codifican para los dominios V_{HH}, de manera que las
65 secuencias de ADN o de ADNc se donen en serie en el vector,
- transformar una célula huésped, especialmente la célula *E. coli*, mediante transfección y recuperar las inmunoglobulinas obtenidas.

ES 2 338 791 T3

La solicitud también describe inmunoglobulinas que son obtenibles mediante un proceso que comprende las etapas de:

- obtener una secuencia de ADN o de ADNc que codifique para un dominio V_{HH} o para una parte del mismo, que tenga un determinado sitio específico de unión al antígeno,

- amplificar el ADN o el ADNc obtenido usando un cebador 5' que contenga un codón de iniciación y un sitio HindIII, y un cebador 3' que contenga un codón de terminación que tenga un sitio XhoI, recombinar el ADN o el ADNc amplificado en los sitios HindIII (posición 2650) y XhoI (posición 4067) de un plásmido pMM984,

- transfectar las células permisivas, especialmente las células NB-E, con el plásmido recombinante,

- recuperar los productos obtenidos.

La expresión correcta puede verificarse con anticuerpos dirigidos contra una región de un dominio V_{HH} , especialmente mediante un ensayo ELISA.

De acuerdo con otra realización particular de este proceso, las inmunoglobulinas se donan en un parvovirus.

En otro ejemplo, estas inmunoglobulinas descritas son obtenibles mediante un proceso que comprende la donación adicional de una segunda secuencia de ADN o de ADNc que tiene otro sitio determinado de unión al antígeno, en el plásmido pMM984.

Tal inmunoglobulina puede caracterizarse además porque es obtenible mediante un proceso en el que el vector es Yep 52 y la célula recombinante transformada es una levadura, especialmente *S. cerevisiae*.

Una inmunoglobulina descrita particular se caracteriza porque tiene una actividad catalítica, especialmente porque está dirigida contra un antígeno que imita un estado activado de un sustrato dado. Estos anticuerpos catalíticos pueden modificarse en el nivel de su sitio de unión, mediante mutagénesis al azar o dirigida, con el fin de incrementar o modificar su función catalítica. Puede hacerse referencia a la publicación de Lerner *et al* (TIBS, noviembre de 1987, 427-430) para la técnica general para la preparación de tales inmunoglobulinas catalíticas.

De acuerdo con una realización descrita preferida, las inmunoglobulinas se caracterizan porque sus regiones variables contienen, en la posición 45, un aminoácido que es diferente de un residuo de leucina, prolina o glutamina.

Además, las inmunoglobulinas de cadena pesada no son productos característicos de los linfocitos de los animales ni de los linfocitos de un paciente humano que sufre de linfopatías. Tales inmunoglobulinas producidas en las linfopatías son monoclonales en su origen y resultan de mutaciones patogénicas en el nivel genómico. Aparentemente no tienen sitio de unión al antígeno.

Las dos cadenas polipeptídicas pesadas de estas inmunoglobulinas pueden unirse mediante una región bisagra, de acuerdo con la definición de Roitt *et al*.

En una realización particular de la invención las inmunoglobulinas correspondientes a las moléculas definidas anteriormente son capaces de actuar como anticuerpos.

El sitio(s) de unión al antígeno de las inmunoglobulinas descritas se localizan en la región variable de la cadena pesada.

En un grupo particular de estas inmunoglobulinas, cada cadena polipeptídica pesada contiene un sitio de unión al antígeno en su región variable, y estos sitios corresponden con la misma secuencia de aminoácidos.

En una realización descrita adicional, las inmunoglobulinas se caracterizan porque sus cadenas polipeptídicas pesadas contienen una región variable (V_{HH}) y una región constante (C_H), de acuerdo con la definición de Roitt *et al*, pero están desprovistas del primer dominio de su región constante. Este primer dominio de la región constante se denomina C_{H1} .

Estas inmunoglobulinas que no tienen el dominio C_{H1} están de manera que la región variable de sus cadenas se una directamente a la región bisagra en la parte C-terminal de la región variable.

Las inmunoglobulinas del tipo descrito anteriormente en este documento pueden comprender las inmunoglobulinas de tipo G y especialmente, las inmunoglobulinas que se definen como inmunoglobulinas de clase 2 (IgG2) o inmunoglobulinas de clase 3 (IgG3).

La ausencia de cadena ligera y del primer dominio constante conduce a una modificación de la nomenclatura de los fragmentos de inmunoglobulinas obtenidos por digestión enzimática, de acuerdo con Roitt *et al*.

ES 2 338 791 T3

Los términos Fc y pFc por una parte, y Fc' y pFc' por la otra, correspondientes respectivamente a los fragmentos de la digestión de papaína y pepsina, se mantienen.

Los términos Fab, F(ab)₂, F(ab')₂, Fabc, Fd y Fv ya no son aplicables en su sentido original, ya que estos fragmentos tienen, o bien una cadena ligera, la parte variable de la cadena ligera o el dominio C_H1.

Los fragmentos obtenidos por la digestión de papaína y compuestos por el dominio VHH de la región bisagra, se denominarán FV_{HH}h o F(V_{HH}h)₂, dependiendo de si permanecen o no unidos mediante puentes disulfuro.

En otra realización de la invención, las inmunoglobulinas que responden a las definiciones dadas anteriormente en este documento pueden originarse a partir de animales, especialmente a partir de animales de la familia de los camélidos. Los inventores han encontrado que las inmunoglobulinas de cadena pesada que están presentes en los camélidos no están asociadas con una situación patológica que induciría a la producción de anticuerpos anormales con respecto a las inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Partiendo de la base de un estudio comparativo de camélidos del viejo mundo (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*) y de camélidos del nuevo mundo (por ejemplo *Lama Paccos*, *Lama Glama* y *Lama Vicugna*), los inventores han demostrado que las inmunoglobulinas de la invención, que están desprovistas de cadenas polipeptídicas ligeras, se encuentran en todas las especies. No obstante, las diferencias pueden ser evidentes en el peso molecular de estas inmunoglobulinas, dependiendo de los animales. En especial, el peso molecular de una cadena pesada contenida en estas inmunoglobulinas puede ser desde aproximadamente 43 kd hasta aproximadamente 47 kd, en particular, 45 kd.

Ventajosamente, las inmunoglobulinas de cadena pesada de la invención se secretan en la sangre de los camélidos.

Las inmunoglobulinas de acuerdo con esta realización particular son obtenibles mediante purificación a partir de suero de camélidos, y un proceso para la purificación se describe en detalle en los ejemplos. En el caso en el que las inmunoglobulinas se obtienen a partir de los Camélidos, las inmunoglobulinas no están en su entorno biológico natural.

La solicitud describe la inmunoglobulina IgG2 como obtenible mediante purificación a partir del suero de los camélidos puede caracterizarse porque:

- no se adsorbe mediante cromatografía en columna de Sepharosa Proteína G
- se adsorbe mediante cromatografía en columna de Sepharosa Proteína A
- tiene un peso molecular de alrededor de 100 kd tras la elución con un tampón de pH 4,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%), ajustado a pH 4,5 mediante NaOH),
- consiste en cadenas polipeptídicas pesadas γ 2 de un peso molecular de alrededor de 46 kd, preferiblemente de 45 tras reducción.

De acuerdo con la solicitud, otro grupo de inmunoglobulinas correspondientes a IgG3, obtenibles mediante purificación a partir del suero de los Camélidos, se caracteriza porque la inmunoglobulina:

- se adsorbe mediante cromatografía en una columna de Sepharosa Proteína A,
- tiene un peso molecular de alrededor de 100 kd tras la elución con un tampón de pH 3,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%),
- se adsorbe mediante cromatografía en una columna de Sepharosa Proteína G y se eluye con un tampón a pH 3,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%),
- consiste en cadenas polipeptídicas pesadas γ 3 de un peso molecular de alrededor de 45 kd, en particular entre 43 y 47 kd tras reducción.

Las inmunoglobulinas descritas que están desprovistas de cadenas ligeras, comprenden no obstante en sus cadenas pesadas, una región constante y una región variable. La región constante comprende diferentes dominios.

La región variable de estas inmunoglobulinas comprende estructuras (FW) y regiones que determinan la complementaridad (CDR), especialmente 4 estructuras y 3 regiones de complementaridad. Se distingue de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas, especialmente por el hecho de que esta región variable puede contener por sí misma uno o varios sitios de unión al antígeno, sin contribución de la región variable de una cadena ligera que está ausente.

ES 2 338 791 T3

Las secuencias de aminoácidos de las estructuras 1 y 4 comprenden, entre otros, secuencias de aminoácidos respectivamente que pueden seleccionarse de los siguientes:

para el dominio de la estructura 1

```

5      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
10     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
15     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 E F E P E E
20

```

para el dominio de la estructura 4

```

      W G Q G T Q V T V S S
25     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
30     R G Q G T Q V T V S L

```

para el dominio CDR3

```

35     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
40     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
45     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
50     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
55     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
60     D G W T R K E G G I G L P W S V O C E D G Y N Y
      D S Y P C H L L - - - - - D V
65     V E Y P I A D M C S - - - - - R Y

```

Tal como se ha afirmado anteriormente, las inmunoglobulinas descritas están preferiblemente desprovistas de la totalidad de su dominio C_H1.

ES 2 338 791 T3

Tales inmunoglobulinas comprenden los dominios C_{H2} y C_{H3} en la región C-terminal con respecto a la región bisagra.

De acuerdo con una realización descrita particular, la región constante de las inmunoglobulinas comprende los dominios C_{H2} y C_{H3} que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de las siguientes:

para el dominio C_{H2} :

10 **APELLGGPTVFIFPPKPKDVLSITLTP**
 APELPGGPSVFVFPTKPKDVLSISGRP
 APELPGGPSVFVFPPKPKDVLSISGRP
15 **APELLGGPSVFIFPPKPKDVLSISGRP**

para el dominio C_{H3} :

20 **GQTREPQVYTLA**
 GQTREPQVYTLAPXRLEL
 GQPREPQVYTLPPSRDEL
25 **GQPREPQVYTLPPSREEM**
 GQPREPQVYTLPPSQEEM

30 Resulta interesante que los inventores han demostrado que la región bisagra de las inmunoglobulinas de la invención puede presentar longitudes variables. Cuando estas inmunoglobulinas actúen como anticuerpos, la longitud de la región bisagra participará de la determinación de la distancia separando los sitios de unión al antígeno.

35 Preferiblemente, una inmunoglobulina descrita aquí se caracteriza porque su región bisagra comprende desde 0 hasta 50 aminoácidos.

Las secuencias particulares de la región bisagra de las inmunoglobulinas descritas son las siguientes:

40 **GTNEVCKCPKCP**

o,

45 **EPKIPQPQPKPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP**

50 La región bisagra corta corresponde a una molécula de IgG3 y la secuencia bisagra larga corresponde a una molécula IgG2.

55 Los V_{HH} aislados derivados de las inmunoglobulinas de cadena pesada o de las librerías de V_{HH} correspondientes a las inmunoglobulinas de cadena pesada, pueden distinguirse de la clonación de los V_{HH} de las inmunoglobulinas modelo de cuatro cadenas partiendo de la base de las características de la secuencia que caracteriza las inmunoglobulinas de cadena pesada.

60 La región V_{HH} de la inmunoglobulina de cadena pesada del camello muestra varias diferencias con las regiones V_{HH} derivadas de las inmunoglobulinas de 4 cadenas de todas las especies examinadas. A los niveles de los residuos implicados en las interacciones V_{HH}/V_L , se observa una diferencia importante a nivel de la posición 45 (FW) que es leucina prácticamente siempre en las inmunoglobulinas de 4 cadenas (98%), siendo los otros aminoácidos en esta posición prolina (1%) o glutamina (1%).

65 En la inmunoglobulina de cadena pesada del camello, en las secuencias examinadas en la actualidad, la leucina en la posición 45 sólo se encuentra una vez. Podría originarse a partir de una inmunoglobulina de cuatro cadenas. En otros casos, se sustituye por un residuo de arginina, cisteína o ácido glutámico. La presencia de aminoácidos cargados en esta posición debe contribuir a hacer que el V_{HH} sea más soluble.

ES 2 338 791 T3

La sustitución por residuos específicos del camélido, tales como aquellos de la posición 45, parece ser interesante para la construcción de las regiones VHH diseñadas derivadas del repertorio de V_{HH} de las inmunoglobulinas de 4 cadenas.

5 Una segunda característica específica del dominio VHH del camélido es la presencia frecuente de una cisteína en la región CDR₃ asociada con una cisteína en la posición 31 ó 33 del CDR₁ o la región FW2 en la posición 45. La posibilidad de establecer un puente disulfuro entre la región CDR₃ y el resto del dominio variable contribuiría a la estabilidad y la colocación del sitio de unión.

10 Con la excepción de una proteína única del mieloma patológico (DAW), tal puente disulfuro nunca se ha encontrado en las regiones V de la inmunoglobulina derivada de las inmunoglobulinas de 4 cadenas.

15 Las inmunoglobulinas de cadena pesada descritas tienen la ventaja particular adicional de no ser adhesivas. De acuerdo con esto, estas inmunoglobulinas que están presentes en el suero, se agregan mucho menos que las cadenas pesadas aisladas de un inmunoglobulina de cuatro cadenas. Las inmunoglobulinas descritas son solubles a una concentración superior a 0,5 mg/ml, preferiblemente superior a 1 mg/ml y más ventajosamente por encima de 2 mg/ml.

20 Estas inmunoglobulinas llevan además un amplio repertorio de unión al antígeno y sufren maduración de afinidad y especificidad *in vivo*. De acuerdo con esto, permiten el aislamiento y la preparación de anticuerpos que tienen especificidad definida por lo que se refiere a antígenos determinados.

25 Otra propiedad interesante de las inmunoglobulinas es que pueden modificarse y adaptarse especialmente a los humanos. Especialmente, es posible sustituir toda o parte de la región constante de estas inmunoglobulinas mediante toda o parte de una región constante de un anticuerpo humano. Por ejemplo, los dominios C_H2 y/o C_H3 de la inmunoglobulina podrían sustituirse por los dominios C_H2 y/o C_H3 de la inmunoglobulina IgG γ 3 humana.

30 En tales anticuerpos adaptados a los humanos, también es posible sustituir una parte de la secuencia variable, particularmente uno o más de los residuos de estructura que no intervienen en el sitio de unión, por residuos humanos de estructura, o por una parte de un anticuerpo humano.

35 A la inversa, las características (especialmente los fragmentos peptídicos) de las regiones V_{HH} de la inmunoglobulina de cadena pesada podrían introducirse en las regiones V_H o V_L derivadas de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas con, por ejemplo, la finalidad de lograr una mayor solubilidad de las inmunoglobulinas.

40 La invención se refiere a un fragmento de una inmunoglobulina que se ha descrito anteriormente en este documento y especialmente a un fragmento polipeptídico que comprende un dominio variable de una inmunoglobulina que comprende dos cadenas de polipéptido pesadas y está desprovista de cadenas ligeras, en donde cada cadena de polipéptido pesada es capaz de reconocer y fijar un antígeno, en donde el fragmento tiene una región marco 2 (FR2) que tiene una secuencia de aminoácidos entre WFREGPGKEREKIA y WYRQAPGKEREFVS.

45 La invención también se refiere específicamente a un fragmento polipeptídico que comprende un dominio variable de una inmunoglobulina que comprende dos cadenas de polipéptido pesadas y está desprovista de cadenas ligeras, en donde cada cadena de polipéptido pesada es capaz de reconocer y fijar un antígeno, en donde el fragmento tiene una región marco 4 (FR4) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de:

WGQGTQVTVSS

50 RGQGTQVTVSL

WGQGAQVTVSS

WGQGTQVTASS

55 WGQGIQVTASS

FGQGTQVTVSS

60 WGQGTHVTVSS

WGRGTQVTVSS

GDPGTQVTVSS

65 WGQGTLVTVSS.

ES 2 338 791 T3

La solicitud también describe un fragmento seleccionado del grupo siguiente:

- un fragmento que corresponde a una cadena polipeptídica pesada de una inmunoglobulina desprovista de cadenas ligeras,

- los fragmentos obtenidos por la digestión enzimática de las inmunoglobulinas de la invención, especialmente aquellos obtenidos por la digestión parcial con papaína que conduce al fragmento Fc (fragmento constante) y que conduce al fragmento FV_{HH}h (que contiene los sitios de unión al antígeno de las cadenas pesadas) o su dímero F(V_{HH}H)₂, o un fragmento obtenido mediante la digestión adicional con papaína del fragmento Fc, que conduce al fragmento pFc correspondiente a la parte C-terminal del fragmento Fc,

- los fragmentos homólogos obtenidos con otras enzimas proteolíticas,

- un fragmento de al menos 10, y preferiblemente 20, aminoácidos de la región variable de la inmunoglobulina, o la región variable completa, especialmente un fragmento correspondiente a los dominios V_{HH} aislados o a los dímeros V_{HH} unidos al disulfuro de la bisagra,

- un fragmento que corresponde a la región bisagra de la inmunoglobulina, o a al menos 6 aminoácidos de esta región bisagra,

- un fragmento de la región bisagra que comprende una secuencia repetida de Pro-X,

- un fragmento que corresponde a al menos 10, y preferiblemente 20, aminoácidos de la región constante o a la región constante completa de la inmunoglobulina.

La solicitud también describe un fragmento que comprende una secuencia repetida, Pro-X, secuencia repetida que contiene al menos 3 repeticiones de Pro-X, siendo X cualquier aminoácido y preferiblemente Gln (glutamina), Lys (lisina) o Glu (ácido glutámico); un fragmento particular repetido está compuesto por una repetición de 12 veces la secuencia Pro-X.

Tal fragmento puede usarse ventajosamente como un vínculo entre los diferentes tipos de moléculas.

Los aminoácidos de la secuencia Pro-X se escogen entre cualquier aminoácido natural o no natural.

Los fragmentos pueden obtenerse por degradación enzimática de las inmunoglobulinas. También pueden obtenerse por la expresión en células u organismos de la secuencia de nucleótidos que codifica para las inmunoglobulinas, o pueden sintetizarse químicamente.

La solicitud también describe anticuerpos antiidiotipo que pertenecen a las clases de inmunoglobulina de cadena pesada. Tales anti-idiotipos pueden producirse frente a idiotipos humanos o animales. Una particularidad de estos anti-idiotipos es que pueden usarse como vacunas idiotípicas, en particular para la vacunación frente a glicoproteínas o glicolípidos y donde el carbohidrato determina el epítipo.

La solicitud también describe anti-idiotipos capaces de reconocer idiotipos de inmunoglobulinas de cadena pesada.

Tales anticuerpos anti-idiotipo pueden ser anticuerpos singeneicos o alogénicos o xenogeneicos.

La solicitud también describe secuencias de nucleótidos que codifican para toda o parte de una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia peptídica seleccionada de las siguientes:

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

ES 2 338 791 T3

W G Q G T Q V T V S S
 W G Q G T L V T V S S
 5 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
 10
 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 K 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
 40 D S Y P C H L L - - - - - D V
 V E Y P I A D M C S - - - - - R Y
 45
 A P E L L G G P S V F V F P P K P K D V L S I S G X P K
 A P E L P G G P S V F V F P T K P K D V L S I S G R P K
 A P E L P G G P S V F V F P P K P K D V L S I S G R P K
 50 A P E L L G G P S V F I F P P K P K D V L S I S G R P K
 G Q T R E P Q V Y T L A P X R L E L
 G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L
 55 G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M
 G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M
 60 V T V S S G T N E V C K C P K C P A P E L P G G P S V F V F P

0

65

VTVSSEPKIPQPQPKPQPQPKPQPKPEPECTCPKCPAPELLGGPSVFIFP
 GTNEVCKCPKCP
 5 APELPGGPSVFVFP
 EPKIPQPQPKPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP
 10 APELLGGPSVFIFP

Tales secuencias de nucleótidos pueden deducirse de las secuencias de aminoácidos, teniendo en cuenta la degeneración del código genético. Pueden sintetizarse o aislarse a partir de las células que producen las inmunoglobulinas de la invención.

Un procedimiento para la obtención de tales secuencias de ADN se describe en los ejemplos.

La solicitud también describe el ARN, especialmente las secuencias de ARNm que corresponden a esas secuencias de ADN y que también corresponden a las secuencias de ADNc.

Las secuencias de nucleótidos pueden usarse además para la preparación de cebadores apropiados para la detección en las células o la selección de las librerías de ADN o ADNc para aislar las secuencias de nucleótidos que codifican para las inmunoglobulinas de la invención.

Tales secuencias de nucleótidos pueden usarse para la preparación de vectores recombinantes y la expresión de estas secuencias contenidas en los vectores por células huéspedes, especialmente células procarióticas como las bacterias, o también células eucarióticas y, por ejemplo, células CHO, células de insectos, células de simios como las células Vero, o cualquier otra célula de mamífero. Especialmente, el hecho de que las inmunoglobulinas descritas estén desprovistas de cadenas ligeras, permite secretarlas en las células eucarióticas, puesto que no hay necesidad de tener recursos para la etapa que consiste en la formación de la proteína BIP que se requiere en las inmunoglobulinas de cuatro cadenas.

Las inadecuaciones de los métodos conocidos para producir anticuerpos monoclonales o inmunoglobulinas mediante tecnología de ADN recombinante vienen de la necesidad, en la inmensa mayoría de los casos, de clonar simultáneamente los dominios V_H y V_L que corresponden a los sitios de unión específicos de las inmunoglobulinas de 4 cadenas. Los animales, y especialmente los camélidos, que producen inmunoglobulinas de cadena pesada de acuerdo con la invención, y posiblemente otras especies de vertebrados, son capaces de producir inmunoglobulinas de cadena pesada de las cuales, el sitio de unión se localiza exclusivamente en el dominio V_{HH} . A diferencia de las pocas inmunoglobulinas de cadena pesada producidas en otras especies mediante separación de cadenas o mediante clonación directa, las inmunoglobulinas de cadena pesada de los camélidos han sufrido una amplia maduración *in vivo*. Además, su región V ha evolucionado naturalmente para funcionar en ausencia de la V_L . Por tanto, son ideales para producir anticuerpos monoclonales mediante tecnología de ADN recombinante. Como la obtención de los clones específicos de unión al antígeno no depende de un proceso estocástico que necesite un gran número de células recombinantes, esto permite también un examen mucho más amplio del repertorio.

Esto puede hacerse a nivel del repertorio de V_{HH} no reconfigurado, usando ADN derivado de un tejido o célula tipo escogidos arbitrariamente, o a nivel del repertorio de V_{HH} no reconfigurado, usando ADN obtenido a partir de los linfocitos B. Sin embargo, resulta más interesante transcribir el ARNm a partir de las células que producen anticuerpos y clonar el ADNc con o sin amplificación anterior en un vector adecuado. Esto dará como resultado la obtención de anticuerpos que ya han sufrido maduración de afinidad.

El examen de un gran repertorio debe demostrar que es particularmente útil en la búsqueda de anticuerpos con actividades catalíticas.

Por tanto, la solicitud describe librerías que pueden generarse en una forma que incluya parte de la secuencia bisagra. La identificación es simple ya que la bisagra está unida directamente al dominio V_{HH} .

Estas librerías pueden obtenerse mediante clonación del ADNc a partir de células linfoides con o sin amplificación anterior por PCR. Los cebadores de PCR se localizan en las secuencias promotora, líder o de estructura del V_{HH} para el cebador 5' y en la región no traducida bisagra, CH_2 , CH_3 y 3' o cola de poliA para el cebador 3'. Una selección del tamaño del material amplificado permite la construcción de una librería limitada a las inmunoglobulinas de cadena pesada.

En un ejemplo particular, el siguiente cebador 3' en el que se ha construido un sitio KpnI y que corresponde a los aminoácidos 313 a 319 (CGC CAT CAA GGT AAC AGT TGA) se utiliza conjuntamente con los cebadores V_{HH} de ratón descritos por Sestry *et al* y que contienen un sitio Xho

ES 2 338 791 T3

AG GTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG CTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG GTC CAG CTT CTC GAG TCT GG

Sitio XhoI

Estos cebadores producen una librería de inmunoglobulinas de cadena pesada de camélido que comprenden la región V_{HH} (relacionada con el subgrupo III de ratón o de humano), la bisagra y una sección del CH_2 .

En otro ejemplo, el ADNc se poliadenila en su extremo 5' y los cebadores de V_{HH} específicos de ratón se sustituyen por un cebador de poliT con un sitio XhoI no construido, al nivel del nucleótido 12.

CTCGAGT₁₂.

Se utiliza el mismo cebador 3' con un sitio KpnI.

Este método genera una librería que contiene todos los subgrupos de inmunoglobulinas.

Parte del interés en clonar una región que abarca la unión bisagra- CH_2 , es que tanto en $\gamma 2$ como en $\gamma 3$, está presente un sitio Sac inmediatamente después de la bisagra. Este sitio permite injertar la secuencia que codifica para el VHH y la bisagra dentro de la región Fc de otras inmunoglobulinas, en particular la IgG₁ y la IgG₃ humanas que tienen la misma secuencia de aminoácidos en este sitio (Glu₂₄₆ Leu₂₄₇).

Como un ejemplo, la solicitud describe una librería de ADNc compuesto por secuencias de nucleótidos que codifican para una inmunoglobulina de cadena pesada, tal como la obtenida realizando las etapas siguientes:

a) tratar una muestra que contiene células linfoides, especialmente linfocitos periféricos, células del bazo, ganglios linfáticos u otro tejido linfoide procedente de un animal sano, especialmente seleccionado a partir de los Camélidos, con el fin de separar las células linfoides,

b) separar el ARN poliadenilado de otros ácidos nucleicos y componentes de las células,

c) hacer reaccionar el ARN obtenido con una transcriptasa inversa, con el fin de obtener el ADNc correspondiente,

d) poner en contacto el ADNc de la etapa c) con los cebadores 5' correspondientes al dominio V_H del ratón de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas, cebador que contiene un sitio de restricción determinado, por ejemplo un sitio XhoI y con los cebadores 3' que corresponden a la parte N-terminal de un dominio $C_H 2$ que contiene un sitio KpnI,

e) amplificar el ADN,

f) clonar la secuencia amplificada en un vector, especialmente en un vector Bluescript,

g) recuperar los clones hibridando con una sonda correspondiente a la secuencia que codifica para un dominio constante a partir de una inmunoglobulina aislada de cadena pesada.

Esta clonación da origen a clones que contienen secuencias de ADN, incluyendo la secuencia que codifica para la bisagra. Por tanto, permite la caracterización de la subclase de inmunoglobulinas y el sitio SacI útil para injertar el FV_{HH} en la región Fc.

La recuperación de las secuencias que codifican para las inmunoglobulinas de cadena pesada también puede lograrse mediante la selección de los clones que contienen secuencias de ADN que tienen un tamaño compatible con la falta de dominio $C_H 1$.

Es posible, de acuerdo con otra realización descrita, añadir las siguientes etapas entre las etapas c) y d) del procedimiento anterior:

- en presencia de una ADN polimerasa y de trifosfatos de desoxirribonucleótidos, poner en contacto dicho ADNc con cebadores degenerados de oligonucleótido, cuyas secuencias son capaces de codificar para la región bisagra y el dominio V_{HH} N-terminal de una inmunoglobulina, siendo capaces los cebadores de hibridar con el ADNc y capaces de iniciar la extensión de una secuencia de ADN complementaria al ADNc usado como molde,

- recuperar el ADN amplificado.

Los clones pueden expresarse en varios tipos de vectores de expresión. Como un ejemplo que usa un vector Immuno PBS disponible comercialmente (Huse *et al.*: Science (1989) 246, 1275), los clones producidos en Bluescript® de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, se recuperan por PCR usando el mismo XhoI que contiene el cebador 5' y un nuevo cebador 3', que corresponde a los residuos 113-103 en la estructura de las inmunoglobulinas, en que se ha construido un sitio Spe: TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG. Este procedimiento permite la clonación del V_{HH} en el sitio Xho/Spe del vector Immuno PBS. Sin embargo, el extremo 3' del gen no está en fase con el "marcador" de identificación y el codón de terminación del vector. Para lograr esto, el constructo se corta con Spe y los salientes de 4 bases se completan, usando el fragmento Klenow, tras lo cual se vuelve a ligar el vector. Un perfeccionamiento adicional consiste en sustituir el marcador con una poli-histidina, de manera que pueda llevarse a cabo la purificación metálica del VHH clonado. Para lograr eso, se construye primero un oligonucleótido de doble hebra Spe/EcoRI que codifica para 6 histidinas y para un codón de terminación, mediante la síntesis de ambas hebras seguida por calentamiento y templado:

```

15      CTA GTG CAC CAC CAT CAC CAT CAC TAA* TAG*
          AC GTG GTG GTA GTG GTA GTG ATT ATC TTA A

```

El vector que contiene el inserto se digiere entonces con SpeI y EcoRI para eliminar la secuencia marcadora residente que puede sustituirse por la secuencia poli-His/terminación. El V_{HH} producido puede detectarse igualmente usando anticuerpos surgidos contra las regiones V_{HH} del dromedario. Bajo condiciones de laboratorio, las regiones V_{HH} se producen en el vector Immuno PBS en cantidades de mg por litro.

La solicitud también describe una librería de ADN compuesta de secuencias de nucleótidos que codifican para una inmunoglobulina de cadena pesada, tal como la obtenida a partir de las células con genes reconfigurados de inmunoglobulina.

En una realización preferida de la invención, la librería se prepara a partir de células de un animal previamente inmunizado contra un antígeno determinado. Esto permite la selección de anticuerpos que tengan una especificidad preseleccionada para el antígeno usado para la inmunización.

En otra realización descrita, la amplificación del ADNc no se realiza antes de clonar el ADNc.

La cadena pesada de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas permanece secuestrada en la célula por una proteína chaperonina (BIP) hasta que se ha combinado con una cadena ligera. El sitio de unión para la proteína chaperonina es el dominio C_{H1}. Puesto que este dominio está ausente de las inmunoglobulinas de cadena pesada, su secreción es independiente de la presencia de la proteína BIP o de la cadena ligera. Además, los inventores han demostrado que las inmunoglobulinas obtenidas no son adhesivas y de acuerdo con eso, no se agregarán anormalmente.

La solicitud también describe un proceso para la preparación de un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno determinado, consistiendo el sitio de unión al antígeno del anticuerpo en cadenas polipeptídicas pesadas y anticuerpo que está además desprovisto de cadenas polipeptídicas ligeras, proceso que comprende:

- la immortalización de los linfocitos, obtenidos por ejemplo de la sangre periférica de los Camélidos previamente inmunizados con un antígeno determinado, con una célula inmortal y preferiblemente con células de mieloma, con el fin de formar un hibridoma,

- el cultivo de las células immortalizadas (hibridoma) formadas y la recuperación de las células que producen los anticuerpos que tienen la especificidad deseada.

La preparación de los anticuerpos también puede llevarse a cabo sin una inmunización previa de los Camélidos.

Según otro proceso para la preparación de anticuerpos, no se requiere el recurso de la técnica de la célula hibridoma.

Según tal proceso, los anticuerpos se preparan *in vitro* y pueden obtenerse mediante procesos que comprenden las etapas de:

- clonar en vectores, especialmente en fagos y más particularmente en bacteriofagos filamentosos, las secuencias de ADN o de ADNc obtenidas a partir de los linfocitos, especialmente los PEL de los Camélidos previamente inmunizados con determinados antígenos,

- transformar las células procarióticas con los vectores anteriores en condiciones que permitan la producción de anticuerpos,

ES 2 338 791 T3

- seleccionar los anticuerpos por su estructura de cadena pesada y adicionalmente sometiendo a la selección por afinidad al antígeno,

- recuperar los anticuerpos que tienen la especificidad deseada.

En otra realización de la invención, la clonación se realiza en vectores, especialmente en plásmidos que codifican para proteínas de membranas bacterianas. Las células procarióticas se transforman entonces con los vectores anteriores en condiciones que permiten la expresión de anticuerpos en su membrana.

Las células positivas se seleccionan adicionalmente mediante selección de afinidad al antígeno.

Los anticuerpos de cadena pesada que no contienen el dominio C_H1 presentan una clara ventaja a este respecto. En efecto, el dominio C_H1 se une a las proteínas acompañantes de tipo BIP presentes dentro de los vectores eucarióticos y las cadenas pesadas no se transportan fuera del retículo endoplasmático a menos que las cadenas ligeras estén presentes. Esto significa que en las células eucarióticas, la clonación eficaz de las inmunoglobulinas de 4 cadenas en células no mamíferas, tales como células de levaduras, puede depender de las propiedades de la acompañante residente de tipo BIP y por tanto, puede ser muy difícil de lograr. A este respecto, los anticuerpos de cadena pesada de la invención que carecen de dominio C_H1 presentan una ventaja distintiva.

En una realización de la solicitud, la clonación puede realizarse en levaduras, o bien para la producción de anticuerpos, o para la modificación del metabolismo de la levadura. Como ejemplo, puede utilizarse el vector Yep 52. Este vector tiene el origen de replicación (ORI) 2μ de la levadura junto con un marcador de selección Leu 2.

El gen clonado está bajo el control del promotor de la bilis y por consiguiente es inducible por galactosa. Además la expresión puede estar reprimida por la glucosa, lo que permite la obtención de concentración muy elevada de células antes de la inducción.

La clonación entre los sitios BamHi y SalI usando la misma estrategia de producción de genes mediante PCR que la descrita anteriormente, permite la clonación de los genes de la inmunoglobulina de camélido en *E. coli*. Como ejemplo de modulación metabólica que puede obtenerse mediante anticuerpos y propuesta para la levadura, se puede situar la clonación de anticuerpos dirigida contra las ciclinas, que son proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular de la levadura (TIBS 16 430 J.D. Me Kinney, N. Heintz 1991). Otro ejemplo es la introducción mediante ingeniería genética de un anticuerpo dirigido contra el CD₂₈, anticuerpo que sería inducible (por ejemplo, mediante bilis), dentro del genoma de la levadura. El CD₂₈ está implicado en el nivel de la iniciación de la división celular y, por tanto, la expresión de anticuerpos contra esta molécula permitiría un control eficaz de la multiplicación de las células y la optimización de los métodos para la producción en biorreactores o mediante medios de células inmovilizadas.

Todavía en otra realización descrita, el vector de clonación es un plásmido o un vector eucariótico de virus y las células que han de transformarse son células eucarióticas, especialmente células de levaduras, células de mamíferos, por ejemplo las células CHO, o células de simios tales como las células Vero, células de insectos, células de plantas o células de protozoos.

Para más detalles con respecto al procedimiento que ha de aplicarse en cada caso, se hace referencia a la publicación de Marks *et al*, J. Mol. Biol. 1991, 222:581-597.

Además, a partir de las inmunoglobulinas descritas, o a partir de fragmentos de las mismas, pueden prepararse nuevas inmunoglobulinas o derivados.

De acuerdo con esto, pueden prepararse inmunoglobulinas que respondan a las definiciones facilitadas anteriormente, contra determinados antígenos. En especial, la solicitud describe anticuerpos monoclonales o policlonales desprovistos de cadenas polipeptídicas ligeras o antisuero que contiene tales anticuerpos y dirigidos contra determinados antígenos y, por ejemplo, contra los antígenos de agentes patológicos, tales como las bacterias, los virus o los parásitos. Como ejemplo de antígenos o de determinantes antigénicos contra los que pueden prepararse anticuerpos, pueden citarse las glicoproteínas de la cubierta de los virus o los péptidos de las mismas, tal como la glicoproteína de la cubierta externa de un virus VIH o el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

Las inmunoglobulinas descritas también pueden dirigirse contra una proteína, hapteno, carbohidrato o ácido nucleico.

Anticuerpos particulares se dirigen contra el epitopo galactosil α -1-3-galactosa.

Las inmunoglobulinas descritas permiten además la preparación de productos combinados, tal como la combinación de la inmunoglobulina de cadena pesada o de un fragmento de la misma, con una toxina, una enzima, un fármaco o una hormona.

Como ejemplo, puede prepararse la combinación de una inmunoglobulina de cadena pesada que lleve un sitio de unión al antígeno que reconozca un epitopo de inmunoglobulina de mieloma con la toxina abrina o la de lectina del muérdago. Tal constructo tendría sus usos en la terapia específica del paciente.

Otra combinación ventajosa es la que puede prepararse entre inmunoglobulinas de cadena pesada que reconocen un antígeno intestinal de los insectos con una toxina específica para los insectos, tal como las toxinas de los distintos serotipos del *Bacillus thuringiensis* o del *Bacillus sphaericus*. Tal constructo clonado en las plantas puede usarse para incrementar la especificidad o la variedad de huéspedes de las toxinas bacterianas existentes.

La solicitud también propone anticuerpos que tienen diferentes especificidades en cada cadena polipeptídica pesada. Estos anticuerpos multifuncionales, especialmente bifuncionales, podrían prepararse por combinación de dos cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de la invención o una cadena pesada de una inmunoglobulina de la invención con un fragmento de una inmunoglobulina modelo de cuatro cadenas.

La solicitud también describe anticuerpos heteroespecíficos que pueden usarse para la selección de la diana de fármacos o de cualquier sustancia biológica, como las hormonas. En particular, pueden usarse para seleccionar selectivamente la diana de hormonas o citoquinas para una categoría limitada de células. Los ejemplos son una combinación de un anticuerpo murino o humano surgido contra la interleuquina 2 (IL₂) y un anticuerpo de cadena pesada surgido contra las células CD₄. Esto podría usarse para reactivar las células CD₄ que han perdido su receptor de la IL₂.

Las inmunoglobulinas de cadena pesada de la invención descritas también pueden usarse para la preparación de anticuerpos heteroespecíficos. Estos pueden lograrse, o bien de acuerdo con el método descrito anteriormente mediante la reducción de los puentes entre las diferentes cadenas y la reoxidación, de acuerdo con las técnicas usuales, de dos anticuerpos que tienen especificidades diferentes, pero también puede lograrse por clonación seriada de dos anticuerpos, por ejemplo, en el vector Immuno pBS.

En tal caso, se prepara un primer gen correspondiente al dominio V_{HH} comprendido entre el sitio Xho y el sitio Spe, tal como se ha descrito anteriormente. Un segundo gen se prepara después mediante una forma análoga, usando como extremidad 5' un cebador que tienen el sitio Spe y como extremidad 3' un cebador que contiene un codón de terminación y un sitio EcoRI. El vector se digiere entonces con EcoRI y XhoI y además, ambos genes *Vim* se digieren respectivamente por Xho/Spe y Spe/EcoRI.

Tras la unión, ambos genes de la inmunoglobulina se clonan seriadamente. La separación entre ambos genes puede aumentarse por la introducción de codones de adición dentro del cebador 5' SpeI.

En una realización descrita particular, la región bisagra de las inmunoglobulinas IgG2 es semirrígida y por tanto, es apropiada para acoplarse a las proteínas. En tal aplicación, las proteínas o los péptidos pueden unirse a diversas sustancias, especialmente a ligandos, a través de la región bisagra usada como espaciadora. Ventajosamente, el fragmento comprende al menos 6 aminoácidos.

De acuerdo con la revelación, es interesante usar una secuencia que comprenda una secuencia repetida Pro-X, siendo X cualquier aminoácido y preferiblemente, Gln, Lys o Glu, especialmente un fragmento compuesto por al menos una repetición de 3 veces y preferiblemente, por una repetición de 12 veces, para acoplar las proteínas al ligando o para ensamblar diferentes dominios de proteínas.

La región bisagra o un fragmento del mismo también puede usarse para acoplar proteínas a ligandos o para ensamblar diferentes dominios de proteínas.

Las técnicas usuales para el acoplamiento son apropiadas y puede hacerse referencia especial a la técnica de ingeniería de proteínas mediante el ensamblaje de secuencias donadas.

Los anticuerpos descritos podrían usarse como reactivos para el diagnóstico *in vitro* o mediante técnicas de imagen. Las inmunoglobulinas podrían marcarse con radioisótopos, marcadores químicos o enzimáticos o marcadores quimioluminiscentes.

Como ejemplo, y especialmente en el caso de la detección o la observación de inmunoglobulinas mediante técnicas de imagen, un marcador como el tecnecio, especialmente el tecnecio al 99%, es ventajoso. Este marcador puede usarse para el marcaje directo mediante un procedimiento de acoplamiento con las inmunoglobulinas o con fragmentos de las mismas, o por marcaje indirecto tras una etapa de preparación de un complejo con el tecnecio.

Otros marcadores radiactivos interesantes son, por ejemplo, el indio y especialmente el indio III, o el yodo, especialmente el I¹²¹, I¹²⁵ e I¹²³.

Para la descripción de estas técnicas, se hace referencia a la solicitud de patente FR publicada con el número 2649488.

En estas aplicaciones, el pequeño tamaño del fragmento V_{HH} es una ventaja definitiva para la penetración dentro del tejido.

La solicitud también describe los anticuerpos monoclonales que reaccionan con los antiidiotipos de los anticuerpos descritos anteriormente.

La solicitud también describe las células o a los organismos en los que se han clonado las inmunoglobulinas de cadena pesada. Tales células u organismos pueden usarse para el propósito de producir inmunoglobulinas de cadena pesada que tengan una especificidad deseada preseleccionada, o que correspondan a un repertorio particular. También pueden producirse para el propósito de modificación del metabolismo de la célula que las expresa. En el caso de la modificación del metabolismo de las células transformadas con las secuencias que codifican para las inmunoglobulinas de cadena pesada, estas inmunoglobulinas producidas de cadena pesada se usan como ADN antisentido. El ADN antisentido está implicado normalmente en el bloqueo de la expresión de ciertos genes, tal como por ejemplo, en el antígeno de superficie variable de los tripanosomas o de otros patógenos. Asimismo, la producción de la actividad de ciertas proteínas o enzimas podría inhibirse mediante los anticuerpos que se expresan contra esta proteína o enzima dentro de la misma célula.

La solicitud también describe una inmunoglobulina modificada de 4 cadenas o a fragmentos de las mismas, cuyas regiones V_H se han sustituido parcialmente por secuencias específicas o aminoácidos de inmunoglobulinas de cadena pesada, especialmente por secuencias del dominio V_{HH} . Un dominio V_H particular y modificado de una inmunoglobulina de cuatro cadenas, se caracteriza porque la leucina, la prolina o la glutamina de la posición 45 de las regiones V_H se ha sustituido por otros aminoácidos y preferiblemente por arginina, ácido glutámico o cisteína.

Un dominio V_H o V_L adicional modificado de una inmunoglobulina de cuatro cadenas se caracteriza por la unión de los bucles CDR o de las regiones FK mediante la introducción de cisteínas apareadas, seleccionándose la región CDR entre la CDR₁ y la CDR₃, siendo la región FW la región FW₂ y, especialmente, porque una de las cisteínas introducidas está en la posición 31, 33 de la FR₂ o en la 45 de la CDR₂ y la Otra en la CDR₃.

Especialmente, la introducción de cisteínas apareadas es de manera que el bucle del CDR₃ esté unido al dominio FW₂ o al CDR₁ y más especialmente, la cisteína del CDR₃ del V_H está unida a una cisteína en la posición 31 ó 33 del FW₂ o en la posición 45 del CDR₂.

En otra realización descrita, células de plantas pueden modificarse mediante las inmunoglobulinas de cadena pesada, con el fin de que adquieran nuevas propiedades o propiedades incrementadas.

Las inmunoglobulinas de cadena pesada pueden usarse para la terapia genética del cáncer, por ejemplo mediante la utilización de anticuerpos dirigidos contra las proteínas presentes en las células tumorales.

En tal caso, la expresión de uno o dos genes V_{HH} puede obtenerse mediante la utilización de vectores derivados de parvovirus o adenovirus. Los parvovirus se caracterizan por el hecho de que están desprovistos de patogenicidad o casi no son patógenos para las células humanas normales y por el hecho de que son capaces de multiplicarse fácilmente en las células cancerígenas (Russel S.J. 1990, Immunol. Today II. 196-200).

Las inmunoglobulinas de cadena pesada se clonan, por ejemplo, dentro de los sitios HindIII/XbaI del plásmido infeccioso del virus MVM murino (pMM984). (Merchinsky *et al*, 1983, J. Virol. 47, 227-232) y luego se sitúan bajo el control del promotor MVM38.

El gen del dominio VHH se amplifica por PCR mediante el uso de un cebador 5' que contiene un codón de iniciación y un sitio HindIII, el cebador 3' que contiene un codón de terminación y un sitio XbaI.

El constructo se inserta entonces entre las posiciones 2650 (HindIII) y 4067 (XbaI) dentro del plásmido.

La eficacia de la clonación puede comprobarse mediante transfección. El vector que contiene el anticuerpo se introduce entonces en las células permisivas (NB-E) mediante transfección.

Las células se recuperan tras dos días y la presencia de regiones VHH se determina con un ensayo ELISA usando antisuero de conejo que reacciona con la parte V_{HH} .

La solicitud permite además la preparación de anticuerpos catalíticos mediante formas diferentes. La producción de anticuerpos dirigidos contra los componentes que imitan los estados activados de los sustratos (como ejemplo, el vanadato como componente que imita el estado activado del fosfato con el fin de producir sus actividades fosfoesterasas, el fosfato como compuesto que imita la unión peptídica para producir proteasas) permite obtener anticuerpos que tienen una función catalítica. Otra forma de obtener tales anticuerpos consiste en realizar una mutagénesis aleatoria en los clones de anticuerpos, por ejemplo mediante PCR, introduciendo bases anormales durante la amplificación de los clones. Estos fragmentos amplificados obtenidos por PCR se introducen entonces dentro de un vector apropiado para clonación. Su expresión en la superficie de la bacteria permite la detección por el sustrato de los clones que tienen la actividad enzimática. Naturalmente, estos dos enfoques pueden combinarse. Finalmente, partiendo de la base de los datos disponibles sobre la estructura, por ejemplo los datos obtenidos por cristalografía de rayos X o RMN, las modificaciones pueden dirigirse. Estas modificaciones pueden realizarse mediante técnicas usuales de ingeniería genética o mediante síntesis completa. Una ventaja del VHH de las inmunoglobulinas de cadena pesada de la invención es el hecho de que son suficientemente solubles.

Las inmunoglobulinas de cadena pesada pueden producirse además en células de plantas, especialmente en plantas transgénicas. Como ejemplo, las inmunoglobulinas de cadena pesada pueden producirse en plantas usando el plásmido

pMon530 (Roger *et al.* Meth Enzym 153 1566 1987), vector de expresión constitutivo de plantas, tal como se ha descrito para los anticuerpos clásicos de cuatro cadenas (Hiat *et al.* Nature 342 76-78, 1989) usando una vez más los cebadores apropiados de PCR, tal como se ha descrito anteriormente, para generar un fragmento de ADN en la fase correcta.

Otras ventajas y características de la invención se harán evidentes en los ejemplos y figuras siguientes.

Figuras

Figura 1: *Caracterización y purificación de la IgG del camello mediante cromatografía de afinidad en Sepharosa Proteína A y Proteína G (Pharmacia).*

(A) muestra, tras la reducción, el perfil de proteínas de SDS-PAGE de las fracciones adsorbidas y no adsorbidas del suero de *Camelus dromedarius*. La fracción adsorbida en la Proteína A y eluída con NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%, muestra bajo reducción (carril c) tres componentes de cadena pesada de 50, 46 y 43 kd, respectivamente, y la cadena ligera (IgG del conejo en el carril a). Las fracciones adsorbidas en un derivado de Sepharosa Proteína G (Pharmacia), que se ha diseñado para suprimir la región de unión a la albúmina (carril e) y eluído con gly HCl 0,1M, pH 2,7, carecen de la cadena pesada de 46 kd que se recupera en la fracción no adsorbida (carril f). Ninguno de estos componentes está presente en la fracción no adsorbida en la Proteína A (carril d). El carril b contiene los marcadores de peso molecular.

(B) y (C). Mediante elusión diferencial, las fracciones de inmunoglobulinas que contienen la cadena pesada de 50 y 43 kd, pueden separarse. Se adsorben 5 ml del suero de *C. dromedarius* en una columna de Sepharosa Proteína G de 5 ml y la columna se lava exhaustivamente con tampón fosfato 20 mM, pH 7,0. Bajo elución con tampón a pH 3,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%), se eluye un componente de 100 kd que da, bajo reducción, una cadena pesada de 43 kd, (carril 1). Una vez que la absorbancia del eluyente de la columna ha caído hasta el nivel previo, puede eluirse un segundo componente de la inmunoglobulina de 170 kd con tampón a pH 2,7 (glicina HCl al 0,1 M). Esta fracción, bajo reducción, da una cadena pesada de 50 kd y una amplia banda de cadena ligera (carril 2).

La fracción no adsorbida sobre la Proteína G se lleva entonces sobre una columna de Sepharosa Proteína A de 5 ml. Tras lavar y eluir con tampón a pH 3,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%), se obtiene una tercera inmunoglobulina de 100 kd que consta únicamente de las cadenas pesadas de 46 kd (carril 3).

Figura 2: *Inmunoglobulinas de Camelus bactrianus, Lama vicugna, Lama glama y Lama pacos a la Proteína A (carriles A) y a la Proteína G (carriles G) analizadas sobre SDS-PAGE antes (A) y después (B) de la reducción.*

Se añadieron 10 µl de suero obtenido a partir de diferentes especies a tubos Eppendorf® que contenían 10 mg de Sepharosa Proteína A o Proteína G suspendidos en 400 µl de tampón de inmunoprecipitación a pH 8,3 (NaCl 0,2 M, Tris 0,01 M; EDTA 0,01 M, Triton X100 al 1%, ovoalbúmina al 0,1%). Los tubos se hicieron girar lentamente durante 2 horas a 4°C. Tras la centrifugación, se lavaron los aglomerados 3 veces en el tampón y una vez en el tampón en el que se han suprimido el Triton y la ovoalbúmina. Los aglomerados se resuspendieron entonces en la disolución de la muestra de SDS-PAGE, 70 µl por aglomerado, con o sin ditiotreitól como reductor. Tras hervir durante 3 minutos a 100°C, los tubos se centrifugaron y se analizaron los sobrenadantes.

En todas las especies examinadas las fracciones no reducidas (A) contienen además de las moléculas de aproximadamente 170 Kd también componentes principales menores de aproximadamente 100 Kd. En la muestra reducida (B) las cadenas ligera y pesada constituyentes son detectadas. En todas las especies un componente de cadena pesada (marcado con un asterisco *) está presente en el material eluído de la Proteína A pero ausente en el material eluído de la Proteína G.

Figura 3: *Las IgG₁, IgG₂ e IgG₃ fueron preparadas a partir de suero obtenido de Camelus dromedarius saludables o infectados con Trypanosoma evansi (título CATT 1/160 (3) y analizados por radioinmunoprecipitación o Western Blotting para la actividad anti-tripanosoma.*

(A) lisado de antígenos de *Trypanosoma evansi* marcado con ³⁵S metionina (recuento de 500.000) fue añadido a tubos Eppendorf conteniendo 10 µl de suero o, 20 µl de IgG₁, IgG₂ o IgG₃ en 200 µl de tampón de inmunoprecipitación a pH 8,3 conteniendo 0,1 M TLCK como inhibidor de proteinasa y se hicieron girar lentamente a 4°C durante una hora. Los tubos fueron luego suplementados con 10 mg de Sepharosa Proteína A suspendida en 200 µl del mismo tampón a pH 8,3 e incubados a 4°C durante una hora adicional.

Después del lavado y la centrifugación a 15000 rpm durante 12 s, cada aglomerado fue resuspendido en 75 µl de la solución muestra SDS-PAGE conteniendo DTT y se calentó durante 3 min. a 100°C. Después de la centrifugación en una minifuga Eppendorf a 15000 rpm durante 30 s, 5 µl del sobrenadante fueron salvados para la determinación de la radioactividad y el resto fue analizado por DSD-PAGE y fluorografía. Los recuentos/5 µl de muestra fueron inscritos para cada carril.

(B) 20 µl de IgG₁, IgG₂ e IgG₃ de animales saludables e infectados con tripanosoma fueron separados mediante SDS-PAGE sin reducción o calentamiento previos. Las muestras separadas fueron entonces electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, una parte de la membrana fue teñida con Rojo de Ponceau para localizar el material

proteico y el resto fue incubado con ovoalbúmina 1% en tampón TST (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.05%) para bloquear los sitios de unión a la proteína.

Tras el bloqueo, la membrana se lavó exhaustivamente con el tampón TST y se incubó durante 2 horas con el antígeno de tripanosoma marcado con ^{35}S . Tras el lavado exhaustivo, la membrana se secó y se analizó mediante autorradiografía. Para evitar la unión previa e inespecífica, el lisado marcado de tripanosoma se filtró a través de un filtro millipore de $45\ \mu$ y se incubó con inmunoglobulina y ovoalbúmina de camello sano adsorbida sobre una membrana de nitrocelulosa.

Figura 4: La IgG3 purificada del camello por cromatografía de afinidad en Sepharosa Proteína A, se digiere parcialmente con papaína y se separa en Sepharosa Proteína A.

Se disolvieron 14 mg de IgG3 purificada en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 que contenía EDTA 2 mM. Se digirieron mediante 1 hora de incubación a 37°C con mercuripapaína (enzima al 1% en proporción de proteína) activada mediante cisteína $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$. La digestión se bloqueó por la adición de yodoacetamida en exceso ($4 \cdot 10^{-2}\text{M}$) (13). Tras la centrifugación del digerido en una centrífuga Eppendorf durante 5 min a 15.000 rpm, los fragmentos de papaína se separaron en una columna de Sepharosa Proteína A en las fracciones de unión (B) y de no unión (NB). La fracción de unión se eluyó de la columna con tampón glicina HCl 0,1 M a pH 1,7.

Figura 5: Presentación esquemática de un modelo para las moléculas de IgG3 desprovistas de cadenas ligeras. inmunoglobulinas que tienen cadenas ligeras.

Figura 6:

- Representación esquemática de inmunoglobulinas que tienen cadenas polipeptídicas pesadas y están desprovistas de cadenas ligeras, con respecto a la inmunoglobulina convencional del modelo de cuatro cadenas.
- Representación de una sección bisagra.

Figura 7: Alineación de 17 secuencias de ADN de V_{HH} de las inmunoglobulinas de cadena pesada de camello.

Figura 8: Expresión y purificación de la proteína $V_{\text{HH}}21$ del camello a partir de *E. coli*.

I Anticuerpos de cadena pesada en los camélidos

Cuando se adsorbe el suero de *Camelus dromedarius* en Sepharosa Proteína G, una cantidad apreciable (25-35%) de inmunoglobulinas (1 g) permanece en disolución que puede entonces recuperarse mediante cromatografía de afinidad en Sepharosa Proteína A (fig. 1A). La fracción adsorbida en la Proteína G puede eluirse diferencialmente en una fracción de unión estrecha (25%) que consta de moléculas de un peso molecular (PM) aparente no reducido de 170 kd, y en una fracción de unión más débil (30-45%) que tiene un peso molecular aparente de 100 kd (fig. 15). El componente de 170 kd, cuando se reduce, da cadenas pesadas de 50 kd y cadenas ligeras grandes de 30 kd. La fracción de 100 kd está totalmente desprovista de cadenas ligeras y parece estar compuesta únicamente por cadenas pesadas que, tras la reducción, tienen un PM aparente de 43 kd (Fig. 1C). La fracción que no se une a la Proteína G puede purificarse por afinidad y eluirse de una columna de Proteína A como un segundo componente de 100 kd que, tras la reducción, parece estar compuesto únicamente por cadenas pesadas de 46 kd.

Las inmunoglobulinas de cadena pesada carecen de cadenas ligeras totales hasta el 75% de las moléculas que se unen a la proteína A.

Como las tres inmunoglobulinas se unen a la Proteína A, nos referiremos a ellas como IgG: particularmente, IgG₁ (cadena ligera y cadena pesada $\gamma 1$ (50 kd) que se unen a la Proteína G), IgG₂ (cadena pesada $\gamma 2$ (46 kd) que no se une a la proteína G) e IgG₃ (cadena pesada $\gamma 3$ (43 kd) que se une a la proteína G). Hay una posibilidad de que estas tres sub(clases) pueden subdividirse adicionalmente.

Un estudio comparativo de los camélidos del viejo mundo (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*) y de los camélidos del nuevo mundo (*Lama pacos*, *Lama glama*, *Lama vicugna*) mostraron que las inmunoglobulinas de cadena pesada se encontraron en todas las especies examinadas, a pesar de con diferencias menores en el peso molecular aparente y en la proporción. Los camélidos del nuevo mundo difieren de los camélidos del viejo mundo en que tienen una molécula más grande de IgG₃ (inmunoglobulina de cadena pesada que se une a la Proteína G) en que las cadenas pesadas constituyentes tienen un peso molecular aparente de 47 kd (fig. 2).

La abundancia de inmunoglobulinas de cadena pesada en el suero de los camélidos hace plantearse la pregunta de cuál es su papel en la respuesta inmune y en particular, si llevan especificidad de unión al antígeno y si es así, cómo es de amplio su repertorio. Esta pregunta podría responderse examinando las inmunoglobulinas de los camellos infectados por *Tripanosoma evansi* (*Camelus dromedarius*).

Para este propósito, las fracciones correspondientes de IgG₁, IgG₂, IgG₃ se prepararon a partir del suero de un camello sano y a partir del suero de camellos con un título elevado de antitripanosoma, medido mediante el Ensayo de Aglutinación (3). En radioinmunoprecipitación, se demostró que la IgG₁, la y la IgG₃ derivadas del camello infectado,

que indican amplia heterogeneidad y complejidad de repertorio (Fig. 3A), se unen a un gran número de antígenos presentes en un lisado de tripanosoma marcado por ^{35}S metionina.

En los experimentos de inmunotransferencia, el lisado de tripanosoma marcado con ^{35}S metionina se une a IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 separadas por SDS-PAGE, obtenidas a partir de animales infectados (Fig. 3B).

Esto lleva a concluir que las cadenas pesadas del camélido IgG_2 e IgG_3 son auténticos anticuerpos que unen antígenos.

Un paradigma inmunológico establece que un repertorio amplio de anticuerpos se genera por la combinación de los repertorios de la región variable V de la cadena ligera y la cadena pesada (6). Las inmunoglobulinas de cadena pesada del camello parecen contradecir este paradigma.

Las inmunoglobulinas se caracterizan por un patrón complejo de IEF (isoelectroenfoque) que refleja su heterogeneidad extrema. Para determinar si las dos cadenas pesadas que constituyen la IgG_2 y la IgG_3 son o no idénticas, se observó el patrón de isoelectroenfoque (I.E.F) antes y después de la separación de la cadena mediante reducción y alquilación usando yodoacetamida como agente alquilante.

Como este agente alquilante no introduce cargas adicionales en la molécula, los monómeros resultantes de la reducción y la alquilación de una cadena homodímera pesada tendrá prácticamente el mismo punto isoelectrónico que el dinero, mientras que si se derivan de un heterodímero de cadena pesada, en la mayoría de los casos los monómeros diferirán suficientemente en el punto isoelectrónico para generar un patrón diferente en I.E.F.

Bajo reducción y alquilación por yodoacetamida, el patrón observado no está modificado para la IgG_2 y la IgG_3 de *Camelus dromedarius*, indicando que estas moléculas están compuestas de dos cadenas pesadas idénticas que migran a la misma posición que la molécula no reducida a partir de la que se han originado.

Por el contrario, el patrón de T.E.F. de la IgG_1 se modifica completamente tras la reducción, ya que el punto isoelectrónico de cada molécula se determina por la combinación de los puntos isoelectrónicos de las cadenas ligera y pesada, que tras la separación, migrarán a posiciones diferentes.

Estos hallazgos indican que las cadenas pesadas solas pueden generar un amplio repertorio y cuestionan la contribución de la cadena ligera al repertorio útil del anticuerpo. Si esta necesidad se anula, ¿qué otro papel desempeña la cadena ligera?

Normalmente, la cadena pesada aislada de las inmunoglobulinas de mamífero tienden a agregarse considerablemente, pero sólo se solubilizan mediante las cadenas ligeras (8, 9) que se unen al dominio $\text{C}_\text{H}1$ de la cadena pesada.

En humanos y ratones, varios mielomas espontáneos o inducidos producen una inmunoglobulina patológica compuesta únicamente por cadenas pesadas (enfermedad de la cadena pesada). Estas cadenas pesadas proteicas del mieloma llevan deleciones en los dominios $\text{C}_\text{H}1$ y V_HH (10). La razón por la que las cadenas pesadas de longitud completa no dan lugar a cadenas pesadas secretadas en tales inmunoglobulinas patológicas, parece provenir del hecho de que la síntesis de Ig implica una proteína chaperonina, la proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina o BIP (11), que normalmente está sustituida por la cadena ligera (12). Es posible que el papel primordial de la cadena ligera en las inmunoglobulinas del modelo de cuatro cadenas es el de un acompañante asignado a la cadena pesada y que la aparición de los repertorios de cadena ligera sólo ha sido una ventaja evolutiva.

Las cadenas γ_2 y γ_3 son considerablemente más cortas que la cadena γ normal de mamífero. Esto sugeriría que se han producido deleciones en el dominio $\text{C}_\text{H}1$. Las diferencias en los tamaños de las inmunoglobulinas γ_2 y γ_3 de los camélidos del viejo y del nuevo mundo, sugieren que las deleciones se produjeron en varias etapas evolutivas, especialmente en el dominio $\text{C}_\text{H}1$.

II Las inmunoglobulinas de cadena pesada de los camélidos carecen del dominio $\text{C}_\text{H}1$

La estrategia seguida para investigar la estructura primaria de la inmunoglobulina de cadena pesada es una combinación de proteína y secuenciación de ADNc; la secuenciación de la proteína es necesaria para identificar las flexibilidades de secuencia características de cada inmunoglobulina. El extremo N-terminal de la inmunoglobulina que se deriva del repertorio de la región variable de la cadena pesada sólo da información sobre los subgrupos de V_HH (región variable de la cadena pesada) y no puede usarse para la identificación de clase o de subclase. Esto significa que los datos de la secuencia han de obtenerse a partir de los sitios internos de división enzimática o química.

Una combinación de digestión de papaína y cromatografía de afinidad a la Proteína A permitieron la separación de varios fragmentos que dan información sobre la estructura general de la IgG_3 .

La IgG_3 del camello (*Camelus dromedarius*) purificada mediante cromatografía de afinidad en Sepharosa Proteína A se digirió parcialmente con papaína y el digesto se separó en Sepharosa Proteína A en fracciones de unión y de no unión. Estas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción y no reducción (fig 4).

La fracción unida contenía dos componentes, uno de 28 kd y uno de 14,4 kd, además de material no dividido o parcialmente dividido. Se separaron bien mediante electroforesis en gel (a partir de geles preparativos de SDS-PAGE al 19%) bajo condiciones no reductoras, y se purificaron adicionalmente por electroelución (en bicarbonato de amonio 50 mM, SDS al 0,1% (p/v) usando un electroeluidor). Tras la liofilización de estas fracciones electroeluidas, el SDS restante se eliminó mediante precipitación de la proteína a través de la adición de etanol al 90%, mezclando e incubando la mezcla durante la noche a -20°C (14). La proteína precipitada se recogió en un aglomerado mediante centrifugación (15.000 rpm, 5 min) y se usó para la secuenciación de la proteína. La secuenciación del extremo N-terminal se llevó a cabo usando la química automatizada de Edman de un secuenciador líquido de proteínas mediante impulsos de Applied Biosystem 477A. Los aminoácidos se identificaron como sus derivados de feniltiohidantoína (PTH) usando un analizador de PTH de Applied Biosystem 120. Todos los productos químicos y los reactivos se compraron de Applied Biosystems. Los análisis de los datos cromatográficos se llevaron a cabo usando el software de Applied Biosystems versión 1.61. En cada caso, el análisis de la secuencia dirigido por ordenador se confirmó por inspección directa de los cromatogramas a partir del analizador de PTH. Las muestras de la secuenciación de la proteína se disolvieron o bien en ácido trifluoroacético (TFA) al 50% (v/v) (fragmento de 28 kd) o en TFA al 100% (fragmento de 14 kd). Las muestras de la proteína disuelta equivalentes a 2000 pmol (fragmento de 28 kd) o a 500 pmol (fragmento de 14 kd) se aplicaron a discos de fibra de vidrio tratados con TFA. Los discos de fibra de vidrio se recubrieron con BrioBrene (3 mg) y se preciclaron una vez antes de usarlos.

La secuenciación del extremo N-terminal del fragmento de 28 kd da una secuencia homóloga a la parte N-terminal del dominio C_{H2} de γ y por tanto, al extremo N-terminal del fragmento Fe. La secuencia N-terminal del fragmento de 14,4 kd corresponde a la última lisina de un C_{H2} de γ y al extremo N-terminal de un dominio C_{H3} de γ (Tabla 1). El peso molecular (PM) de los fragmentos de papaína y la identificación de sus secuencias N-terminales llevaron a concluir que los dominios C_{H2} y C_{H3} de las cadenas pesadas γ 3 son normales en tamaño y que la delección debe producirse, o bien en el dominio C_{H1}, o en el V_{HH} para generar la cadena γ 3 más corta. Las fracciones que no se unen a la Sepharosa Proteína A contienen dos bandas de 34 y 17 kd que están más difusas en SDE-PAGE, indicando que se originan a partir de la parte variable N-terminal de la molécula (fig 4).

Bajo reducción, se encuentra una única banda difusa de 17 kd, indicando que la de 34 kd es un dímero unido por un puente disulfuro del componente de 17 kd. El fragmento de 34 kd contiene aparentemente la bisagra y el dominio V_{HH} del extremo N-terminal.

Los datos de la secuencia de proteínas también puede usarse para construir cebadores degenerados de oligonucleótidos que permiten la amplificación de PCR del ADNc o del ADN genómico.

Se ha demostrado que las células procedentes de las células marcadas del bazo del camello reaccionaban con sueros de anti-inmunoglobulina de conejo y camello y que por tanto, el bazo fue un sitio de síntesis de al menos una clase de inmunoglobulina. Por consiguiente, el ADNc se sintetizó a partir del ARNm del bazo del camello. Las condiciones para el aislamiento del ARN fueron las siguientes: el ARN total se aisló a partir del bazo del dromedario mediante el método del isotiocianato de guanidinio (15). El ARNm se purificó con perlas paramagnéticas de oligo T.

La síntesis de ADNc se obtiene usando un molde de ARNm de 1 μ g, un cebador de oligo dT y transcriptasa inversa (BOEHRINGER MAN). La segunda hebra del ADNc se obtiene usando ARNasa H y ADN polimerasa de *E. coli*, de acuerdo con la condición dada por el proveedor.

Las secuencias relevantes se amplificaron por PCR: 5 ng de ADNc se amplificaron por PCR en una mezcla de reacción de 100 μ l (Tris-HCl 10 mM a pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,01% p/v), 200 μ M de cada dNTP y 25 pmoles de cada cebador) cubierto con una capa de aceite mineral (Sigma).

Los cebadores degenerados contienen sitios EcoRI y KpnI y que además están clonados en pUC 18. Tras una ronda de desnaturalización y templado (94°C durante 5 min y 54°C durante 5 min), se añadieron 2 unidades de Marcador ADN polimerasa a la mezcla de la reacción antes de someterlo a 35 ciclos de amplificación: 1 min a 94°C (desnaturalizar) 1 min a 54°C (templar), 2 min a 72°C (alargar). Para amplificar las secuencias de ADN entre los dominios V_{HH} y C_{H2}, (# 72 clones), se llevó a cabo la PCR en las mismas condiciones, con la excepción de que la temperatura de templado se incrementó hasta 60°C.

Un clon examinado (#56/36) tenía una secuencia correspondiente a la parte N-terminal de un dominio C_{H2} idéntico a la secuencia del fragmento de 28 kd. La disponibilidad de estos datos de secuencia permitieron la construcción de un cebador 3' exacto y la clonación de la región entre el extremo N-terminal del dominio V_{HH} y el C_{H2}.

Los cebadores 5' correspondientes al V_{HH} (16) del ratón y que contenían un sitio de restricción XhoI se usaron junto con el cebador 3' en el que se había insertado un sitio KpnI y las secuencias amplificadas se clonaron en pBluescript®. El clon #56/36 que presentaba dos sitios HaeIII internos, se digirió con esta enzima para producir una sonda para identificar los clones positivos de la PCR.

Tras la amplificación, los productos de la PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 1,2% (p/v). El aclaramiento de los productos de la PCR incluyó una extracción de fenol-cloroformo, seguida por purificación adicional por HPLC (columna GEN-PAC FAX, Waters) y finalmente usando el kit MERMAID o GENE CLEAN II, BIO 101, Inc) según fuese apropiado. Tras estas etapas de purificación, el ADNc amplificado se digirió entonces con EcoRI y KpnI para

los clones de la serie #56 y con XhoI y KpnI para los clones de la serie #72. Una extracción final con fenol-cloroformo precedida por la ligación en pUC 18 (clones de la serie #56) o en pBluescript® (clones de la serie #72).

5 Todos los clones obtenidos fueron más pequeños de 860 pares de base de lo que se esperaba si poseían una región completa V_{HH} y C_H1 . Los datos parciales de la secuencia correspondientes al N'-terminal de la región V_{HH} revelan que de entre 20 clones, 3 fueron idénticos y posiblemente no independientes. Las secuencias obtenidas se asemejan al subgrupo III humano y a los subgrupos murinos IIIa y IIIb (Tabla 2).

10 Se obtuvieron los clones correspondientes a dos juegos diferentes de secuencias proteicas C_H2 . Un primer juego de secuencias (#72/41) tenía una región C_H2 N-terminal idéntica a la obtenida mediante secuenciación de proteínas de los fragmentos de papaína de 28 kd de la cadena pesada $\gamma3$, una corta región bisagra que contenía 3 cisteínas y una región variable correspondiente a los residuos de la estructura (FR4) codificada por los minigenes J que se adhieren a la bisagra. El dominio C_H1 falta por completo. Este ADNc corresponde a la cadena $\gamma3$ (Tabla 4).

15 En una secuencia estrechamente relacionada (#72/1), la prolina de la posición 259 está sustituida por treonina.

La secuencia correspondiente al C_H3 y a la parte restante del C_H2 se obtuvo por PCR del ADNc usando como cebador KpnI, un poliT en el que el sitio de restricción KpnI se había insertado en el extremo 5'. La secuencia total de la cadena $\gamma3$ corresponde con un peso molecular (PM) que está en concordancia con los datos obtenidos a partir de la electroforesis en SDS-PAGE.

20 La secuencia de esta cadena $\gamma3$ presenta similitudes con otras cadenas γ , excepto que carece del dominio C_H1 , siendo el dominio V_{HH} adyacente a la bisagra.

25 Una o las tres cisteínas podrían ser probablemente responsables de mantener a las dos cadenas $\gamma3$ juntas.

Los resultados han permitido definir un modelo para la molécula IgG3 basado en la secuencia y en la rotura por papaína (fig. 5).

30 La papaína puede romper la molécula a cada lado de los disulfuros de la bisagra y también entre C_H2 y C_H3 . Bajo condiciones no reductoras, los dominios V_{HH} de la IgG3 pueden aislarse como dímero unido por disulfuro o como monómero, dependiendo del sitio de rotura de la papaína.

Un segundo juego de clones #72/29 tenía una secuencia ligeramente diferente para el C_H2 y se caracterizaba por una bisagra muy larga precedida inmediatamente por el dominio variable. Esta región bisagra tiene 3 cisternas en su extremo C-terminal en una secuencia homóloga a la bisagra de $\gamma3$. Tal segundo juego de clones podría representar la subclase IgG2. Para la parte constante de la $\gamma3$ y también para la supuesta $\gamma2$, la mayoría de los clones son idénticos, mostrando las secuencias específicas de $\gamma2$ o $\gamma3$. Sin embargo, algunos clones, tales como #72/1, muestran diferencias menores. Por ejemplo, en el caso de los clones #72/1 se detectan diferencias en dos nucleótidos.

40 Varios ADNc de las regiones V_{HH} se han secuenciado ahora total o parcialmente, con excepción de una corta región en el extremo N-terminal que se deriva del cebador.

En la traducción, la mayoría muestra las secuencias características Ser₂₁, Cys₂₂ y Tyr₉₀ Tyr₉₁ Cys₉₂, del puente disulfuro intra-región V_{HH} que une los residuos 22 y 92. Todos estos clones tienen una secuencia que corresponde con los residuos de la estructura 4 (FR4) de la región variable que precede inmediatamente la secuencia bisagra postulada (Tabla 3). Esta secuencia se genera por los minigenes J y en la mayoría de los casos es similar a la secuencia codificada por los minigenes J de humano y ratón. La longitud de la secuencia entre la Cys₉₂ de la región y el extremo C-terminal de las regiones V_{HH} es variable y, en las secuencias determinadas, oscila desde 25 hasta 37 aminoácidos, como se podría esperar a partir de las reconfiguraciones de los minigenes J y D que varían en longitud.

55 Surgen varias preguntas importantes por la existencia exclusiva de estas inmunoglobulinas de cadena pesada en una situación no patológica. En primer lugar, ¿son anticuerpos auténticos? Las inmunoglobulinas de cadena pesada obtenidas a partir de los camellos infectados por tripanosoma, reaccionan con un gran número de antígenos de parásitos, tal como se muestra en la parte I de estos ejemplos. Esto implica que el sistema inmune del camélido genera un amplio número de sitios de unión compuestos por dominios V_{HH} únicamente. Esto se confirma por la diversidad de las regiones VHH de las inmunoglobulinas de cadena pesada obtenidas por POR.

60 La segunda pregunta es "¿cómo se secretan?". La secreción de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas que componen las inmunoglobulinas del modelo de cuatro cadenas no se produce bajo condiciones normales. Una proteína chaperonina, la proteína de unión a la cadena pesada, o proteína BIP, evita que las cadenas pesadas se secreten. Es sólo cuando la cadena ligera desplaza a la proteína BIP en el retículo endoplasmático cuando puede producirse la secreción (13).

65 El dímero de cadenas pesadas encontrado en el suero de humano o ratón con la denominada "enfermedad de la cadena pesada", carece de los dominios C_H1 que se piensa que albergan el sitio BIP (14). En ausencia de este dominio, la proteína BIP puede que no se una más y que no evite el transporte de las cadenas pesadas.

La presencia en los camellos de una clase IgG1 compuesta por cadenas pesadas y ligeras que constituyen entre el 25% y el 50% de las moléculas totales de IgG, también plantea el problema de cómo se produce la maduración y el intercambio de clase y de cuál es el papel de la cadena ligera. La cadena ligera del camélido parece inusualmente grande y heterogénea cuando se examina en SDS-PAGE.

La mayor dimensión de un dominio aislado es de 40 Å y la máxima extensión obtenible entre los sitios de unión de una IgG convencional con C_H1 y V_{HH} será del orden de 160 Å (2V_{HH} + 2C_H1) (19). La delección del dominio C_H1 en los dos tipos de anticuerpos de cadena pesada desprovistos de cadenas ligeras, ya secuenciados, tiene como resultado una modificación de esta extensión máxima (fig. 6). En la IgG3, la enorme distancia entre las extremidades de las regiones V_{HH} será del orden de 80 Å (2V_{HH}). Esto podría ser una grave limitación para la aglutinación o el entrecruzamiento. En la IgG2 esto se compensa por la región extremadamente larga de la bisagra, compuesta por una repetición de 12 veces de la secuencia Pro-X (en la que X es Gin, Lys o Glu) y localizada en posición N-terminal con respecto a los puentes disulfuro de la bisagra. Por el contrario, en la IgG3 humana, la bisagra muy grande que también surge aparentemente como resultado de la duplicación de la secuencia, no contribuye a incrementar la distancia que se extiende a lo largo de los dos sitios de unión cuando esta bisagra se intercala con los puentes disulfuro.

El único dominio VHH también podría permitir probablemente la libertad rotacional considerable del sitio de unión frente al dominio Fc.

A diferencia de las cadenas pesadas del mieloma que probablemente resultan de la delección de C_H1 en una única célula que produce anticuerpos, o los anticuerpos de cadena pesada producidos por la donación de expresión (15), los anticuerpos de cadena pesada del camélido (desprovistos de cadenas ligeras) han aparecido en un entorno inmunológico normal y se espera que habrán sufrido refinamiento selectivo en la especificidad y la afinidad que acompaña a la maduración de las células B.

Expresión y purificación de la proteína V_{HH}21 de camello (DR21 en la figura 7) a partir de E. coli

Los clones pueden expresarse en varios tipos de vectores de expresión. Como un ejemplo que usa un vector comercialmente disponible Immuno PBS (Huse *et al.*: Science (1989) 246, 1275), los clones producidos en Bluescript® de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito, se han recuperado por PCR usando el mismo XhoI que contiene el cebador 5' y un nuevo cebador 3' que corresponde a los residuos 113-103 en la estructura de las inmunoglobulinas, en las que se ha construido un sitio Spe: TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG. Este procedimiento permitió la clonación de V_{HH} en el sitio XhoI/Spe del vector Immuno PBS. Sin embargo, el extremo 3' del gen no estaba en fase con el "marcador" de identificación y el codón de terminación del vector. Para lograr eso, el constructo se cortó con Spe y los salientes de 4 bases se completaron usando el fragmento Klenow tras lo cual se volvió a ligar el vector.

- El vector de expresión plásmido ipBS (immunopBS) (Stratagene) contiene una secuencia líder pel B que se usa para la expresión de la cadena de inmunoglobulina en *E. coli* bajo el control del promotor pLAC, un sitio de unión al ribosoma y codones de terminación. Además, contiene una secuencia para un marcador deca péptido C-terminal.

- *E. coli* JM101 que alberga el plásmido ipBS-V_{HH}21 se hizo crecer en 1 l de medio TB con 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 0,1% a 32°C. La expresión se indujo por la adición de IPTG 1 mM (concentración final) a una DO₅₅₀ de 1,0. Tras la inducción durante la noche a 28°C, las células se recogieron mediante centrifugación a 4.000 g durante 10 min (4°C) y se resuspendieron en 10 ml de tampón TES (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, EDTA 0,5 mM, sacarosa 0,5 M). La suspensión se mantuvo en hielo durante 2 horas. Las proteínas periplasmáticas se eliminaron por choque osmótico mediante la adición de 20 ml de tampón TES diluido 1:4 v/v con agua, se mantuvieron en hielo durante una hora y posteriormente se centrifugaron a 12.000 g durante 30 min a 4°C. La fracción periplasmática del sobrenadante se dializó contra Tris-HCl a pH 8,8, NaCl 50 mM, se aplicó en una columna de flujo rápido Q Sepharosa (Pharmacia), se lavó con el tampón anterior y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 50 mM a 1 M en tampón.

Las fracciones que contenían la proteína V_{HH} se purificaron adicionalmente en una columna Superdex 75 (Pharmacia) equilibrada con tampón PBS (fosfato 0,01 M a pH 7,2, NaCl 0,15 M). El rendimiento de la proteína V_{HH} purificada varía desde 2 hasta 5 mg/l por cultivo celular.

Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE(I). La identificación positiva del fragmento VHH del anticuerpo del camello se hizo mediante análisis de Western Blot usando anticuerpo producido en conejos contra la IgGH₃ purificada del camello y un conjugado anti-IgG del conejo - fosfatasa alcalina (II).

Como patrones de la proteína (Pharmacia), se usaron proteínas periplasmáticas preparadas a partir de 1 ml de IPTGJM101 inducida/ipBS-V_{HH}21. La Figura 8 muestra: C,D: fracciones a partir de la cromatografía rápida en columna de S Sepharosa (C:Eluido en NaCl 650 mM, D:Eluido en NaCl 700 mM), E,F:fracciones a partir de la cromatografía en columna Superdex 75.

Como puede observarse, la principal impureza se elimina por la cromatografía de intercambio iónico y la mayoría de las impurezas que quedan se eliminan mediante filtración en gel.

Camello	$\gamma 3$ 28Kd	250	260	270
Clon	#72/1	- L P G G P S V F V F P P K P K D V L S I X G X P - -		
Clon	#72/4	- L P G G P S V F V F P P T K P K D V L S I S G R P - -		
Clon	#72/29	- L P G G P S V F V F P P K P K D V L S I S G R P - -		
Humano	$\gamma 1\gamma 3$	- L L G G P S V F I F P P K P K D V L S I S G R P - -		
CH2	$\gamma 2$	- L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P - -		
	$\gamma 4$	- V A - G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P - -		
		- F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P - -		

	C_{H2}	C_{H3}
	360	370
Camello	$\gamma 3$ 14Kd	- K G Q T R E P Q V Y T L A P X R L E L - -
Humano	$\gamma 1$	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L - -
C_{H2}/C_{H3}	$\gamma 2, \gamma 3$	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M - -
	$\gamma 4$	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M - -

Tabla 1

Comparación de las secuencias C_{H2} y C_{H3} del extremo N-terminal del Camello con las secuencias traducidas del ADNc de las inmunoglobulinas del Camello y con las secuencias y correspondientes humanas. (Numeración según Kabat et al (1987) (7)).

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Derivado del		10	20	30	
Derivado del	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	G G S V Q T G G S L R L S C E I S G L T F D	#72/4		
	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	G G S V Q T G G S L R L S C A V S G F S F S	#72/3		
	E V Q L L S G G G L V Q P G G S L R L S C A S G F T F S	G G S E Q G 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		
			#72/2		
			V _H III _A del ratón		
			V _H III de humano		

Tabla 2:
Una comparación de las regiones Fr1 del extremo N-terminal del V_{HH} del Camello con una proteína del subgrupo V_HIII humana y una proteína del subgrupo V_HIII_A del ratón.
Los residuos específicos invariables del subgrupo están en gris.

ES 2 338 791 T3

TABLA 3

Comparación de algunos residuos de la Estructura 4 encontrados en la región V_{HH} del Camello con los residuos de la Estructura 4 correspondientes a la región consenso de los minigenes J de Humano y Ratón

		Estructura 4	Genes J
	Humano	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
	Murino	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
	Camello	W G Q G T Q V T V S S	Clones de ADNc Clones
		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 Clon
		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

TABLA 4

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

10			20			40		
EVQLVESGGG			LVQPGGSLRL			SCAASG		
GG			SVQGGGSLRL			SCAISG		
GG			SVQAGGSLRL			SCASSS		
70			80			90		
RFTIS			RDNSKNTLYL			QMNSLRAEDTAVY		
RFTIS			QDSTLKTMYL			LMNNLKPEDTGY		
RFTIS			QDSAKNTVYL			QMNSLKPEDTAMY		
						110		
						WGQGTIVT		
						WGQGTQVT		
						WGQGTQVT		

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

C _R 1 humano		Bisagra	C _R 2
gamma 3 humano	KVDKRV	ELKTPLGDTTHTCPRCP	
		EPKCSDTPPPCPRCP	
		EPKSCDTPPPCPPCP	APELLGG PSVFLEFP
gamma 1 humano	KVDKK	AEPKSCDKTHTCPPCP	APELLGG PSVFLEFP
gamma 2 humano	KVKVTV	ERKCCVECPPCP	APPVAG- PSVFLEFP
gamma 4 humano	KVDKRV	ESKYCPPCPSCP	APEFLGG PSVFLEFP

TABLA 5 (2)

Bibliografía

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

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento polipeptídico que comprende un dominio variable de una inmunoglobulina que comprende dos cadenas de polipéptido pesadas y está desprovista de cadenas ligeras, obteniéndose dicha inmunoglobulina a partir de Camélidos, en donde cada cadena de polipéptido pesada es capaz de reconocer y fijar un antígeno, en donde el fragmento tiene una región marco 2 (FR2) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre WFREGPG KREGIA, y WYRQAPGKEREFVS.

2. Un fragmento polipeptídico que comprende un dominio variable de una inmunoglobulina que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas y está desprovista de cadenas ligeras, en donde cada una de las cadenas de polipéptido pesadas es capaz de reconocer y fijar un antígeno, en donde el fragmento tiene una región marco 4 (FR4) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de:

WGQGTQVTVSS
RGQGTQVTVSL
WGQGAQVTVSS
WGQGTQVTASS
WGQGIQVTASS
FGQGTQVTVSS
WGQGTHVTVSS
WGRGTQVTVSS
GDPGTQVTVSS
WGQGTLVTVSS.

3. Un fragmento polipeptídico de inmunoglobulina humanizado que contiene un sitio de fijación de antígeno y que comprende un dominio variable de una inmunoglobulina que comprende dos cadenas de polipéptido pesadas y está desprovista de cadenas ligeras, originándose dicha inmunoglobulina a partir de un Camélido, en donde en dicho fragmento polipeptídico, los residuos de aminoácidos de la región marco de dicho dominio variable están reemplazados por residuos marco humanos.

4. Un fragmento polipeptídico humanizado que contiene un sitio de fijación de antígeno y que comprende un dominio variable de una inmunoglobulina que comprende dos cadenas de polipéptido pesadas y está desprovista de cadenas ligeras, originándose dicha inmunoglobulina a partir de un Camélido, en donde dicho fragmento polipeptídico comprende un dominio variable de dicha cadena polipeptídica pesada, enlazada a la totalidad o parte de la región constante de un anticuerpo humano.

5. Anticuerpo que es expresado por dos genes clonados serialmente que corresponden a los dominios variables VHH de una inmunoglobulina que comprende dos cadenas de polipéptido pesadas y que se obtiene de Camélidos en donde dichas cadenas de polipéptido pesadas son capaces de reconocer y fijar un antígeno, anticuerpo que es heteroespecífico y comprende fragmentos VHH expresados que tienen especificidades diferentes.

6. Anticuerpo multifuncional de acuerdo con la reivindicación 5, que es un anticuerpo bifuncional.

7. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que es heteroespecífico y adecuado para direccionamiento de una sustancia biológica o un fármaco.

8. Un fragmento o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se expresa en una célula hospedadora.

9. Un fragmento polipeptídico o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es sintetizado.

10. Un fragmento polipeptídico o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que fija específicamente una proteína, hapteno, carbohidrato o ácido nucleico.

11. Un fragmento polipeptídico o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que tiene actividad catalítica.

12. Un fragmento polipeptídico o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que está conjugado con una toxina, una enzima, un fármaco o una hormona.

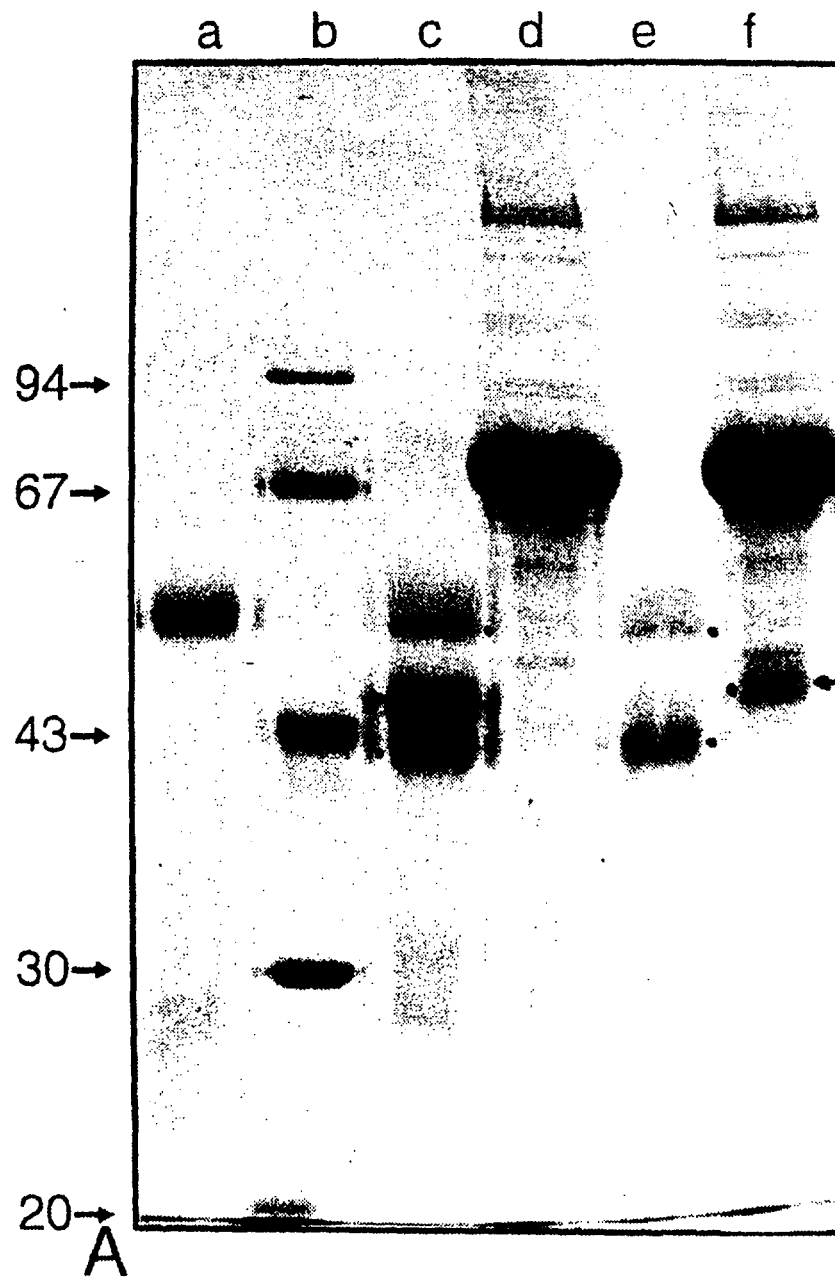


FIGURA 1A

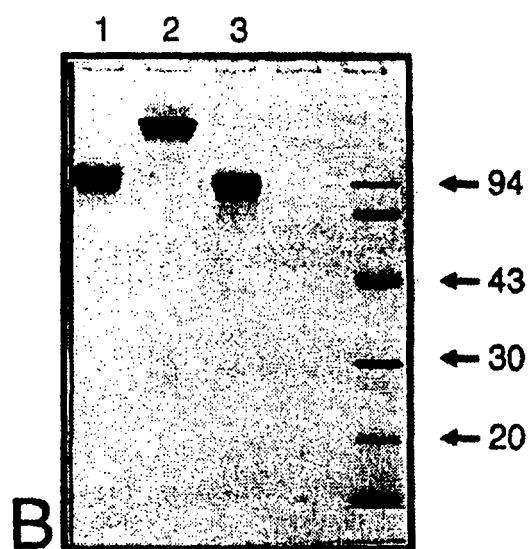


FIGURA 1B

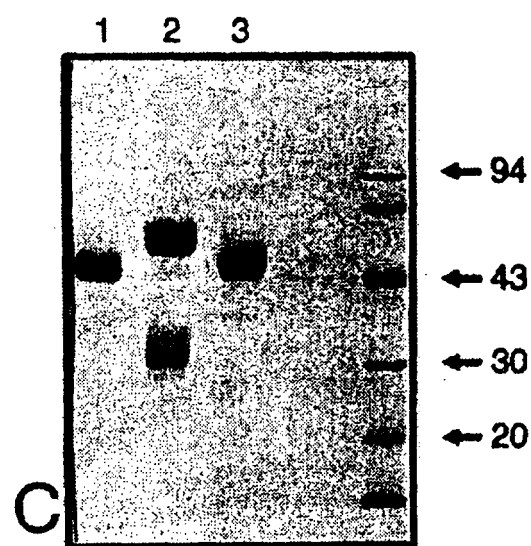


FIGURA 1C

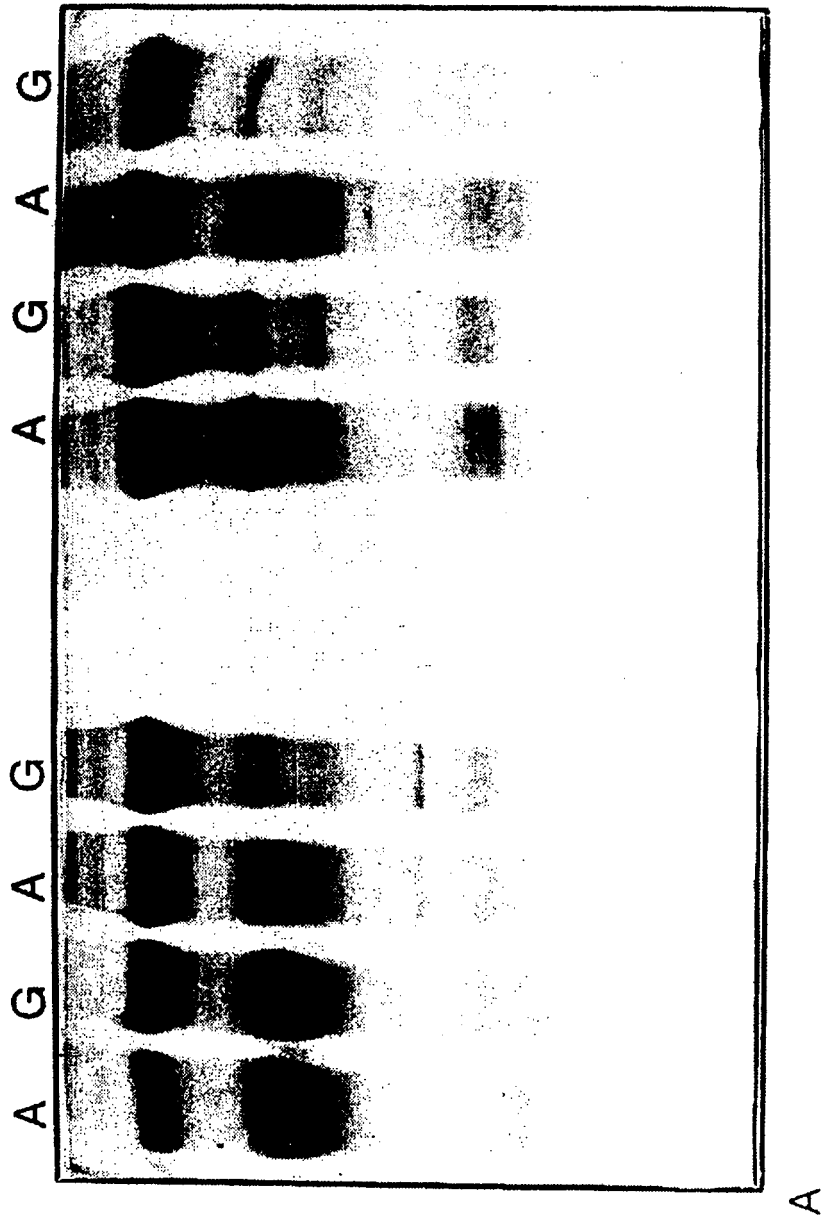


FIGURA 2A

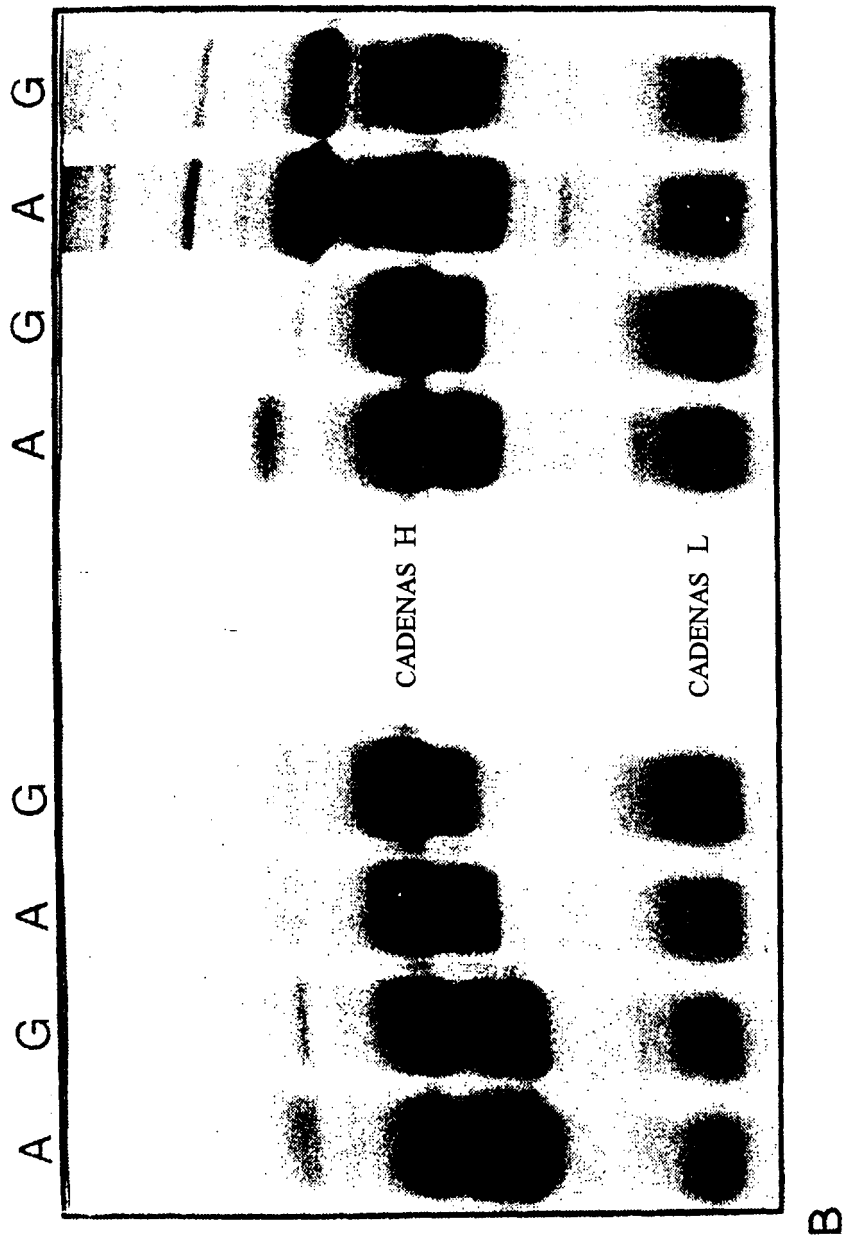


FIGURA 2B

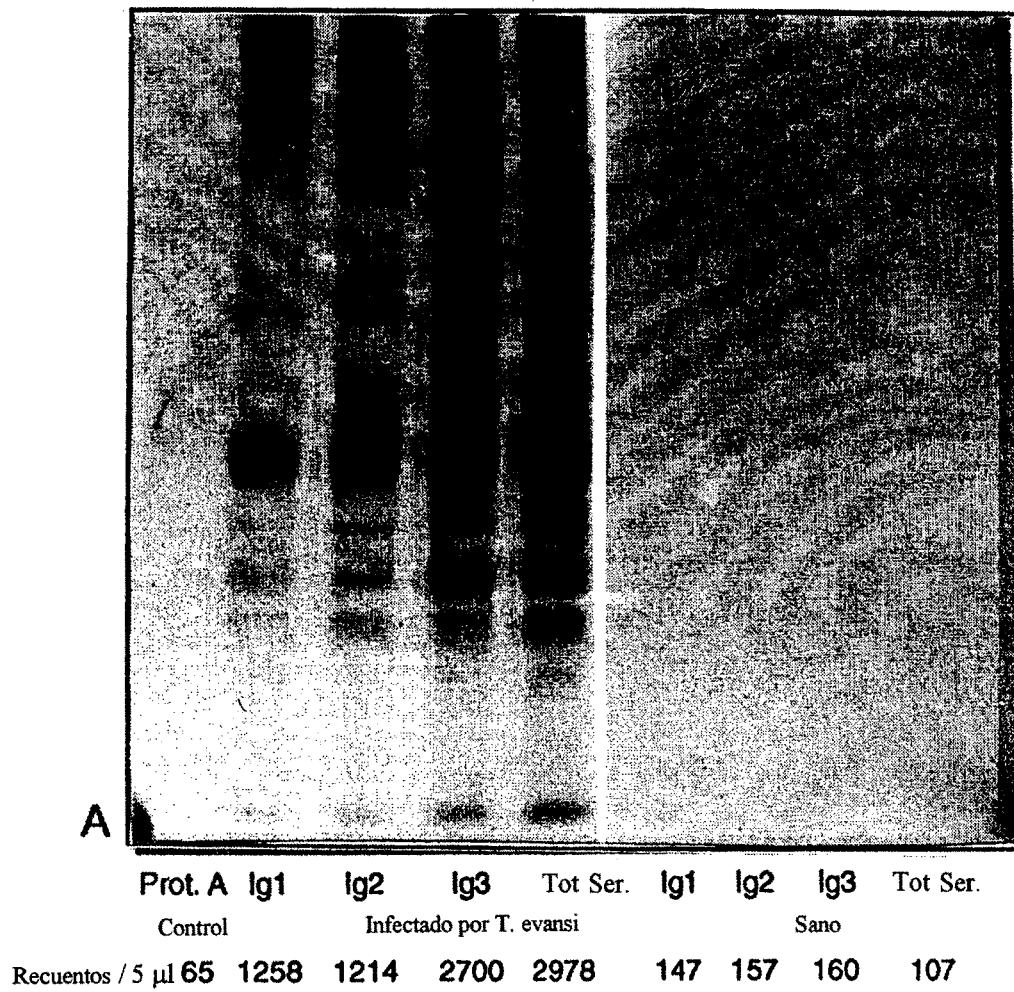


FIGURA 3A

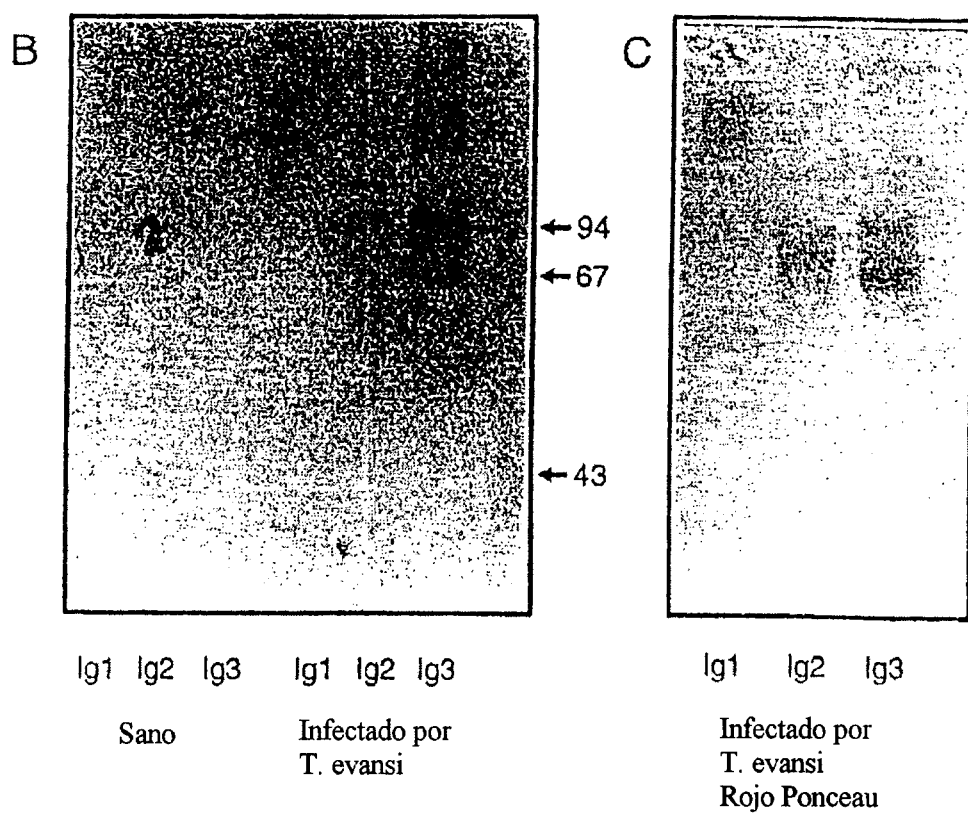


FIGURA 3B

FIGURA 3C

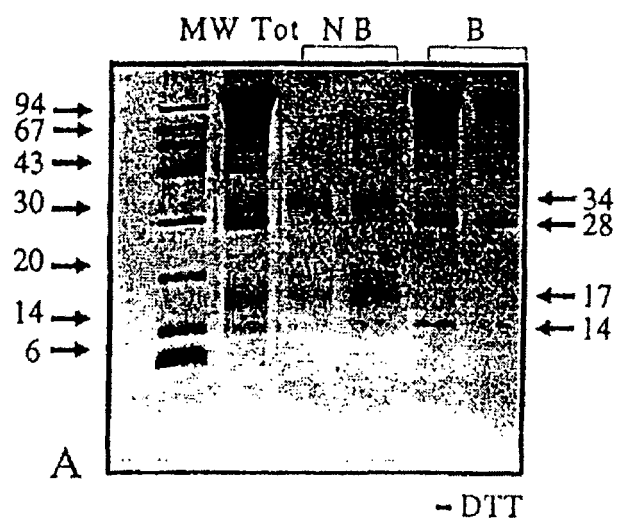


FIGURA 4A

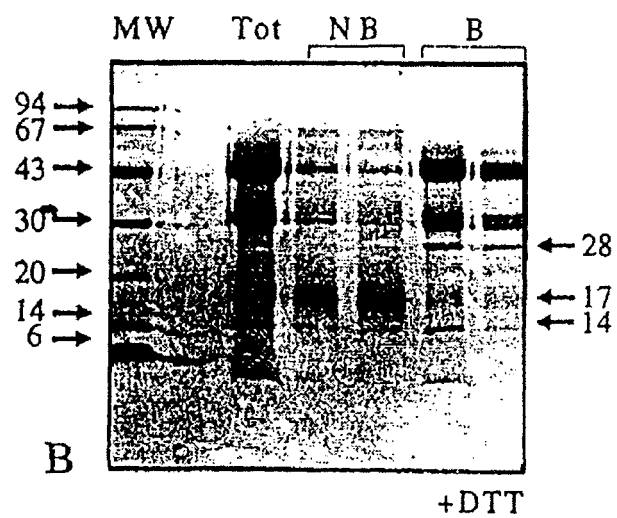


FIGURA 4B

Análisis de los fragmentos cortados
por papaína en la IgG₃ por SDS-PAGE

Modello para la IgG3 de camello

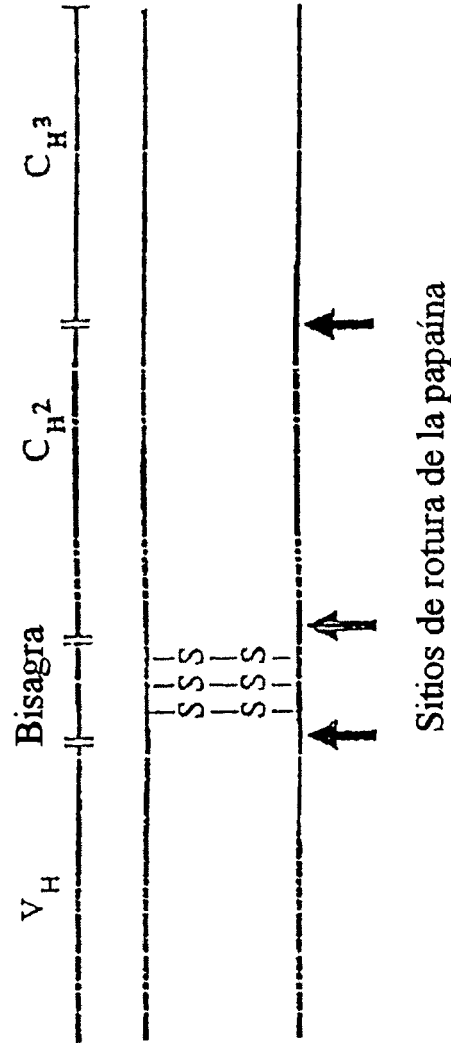


Fig. 5: Representación esquemática del modelo de IgG3 del camello

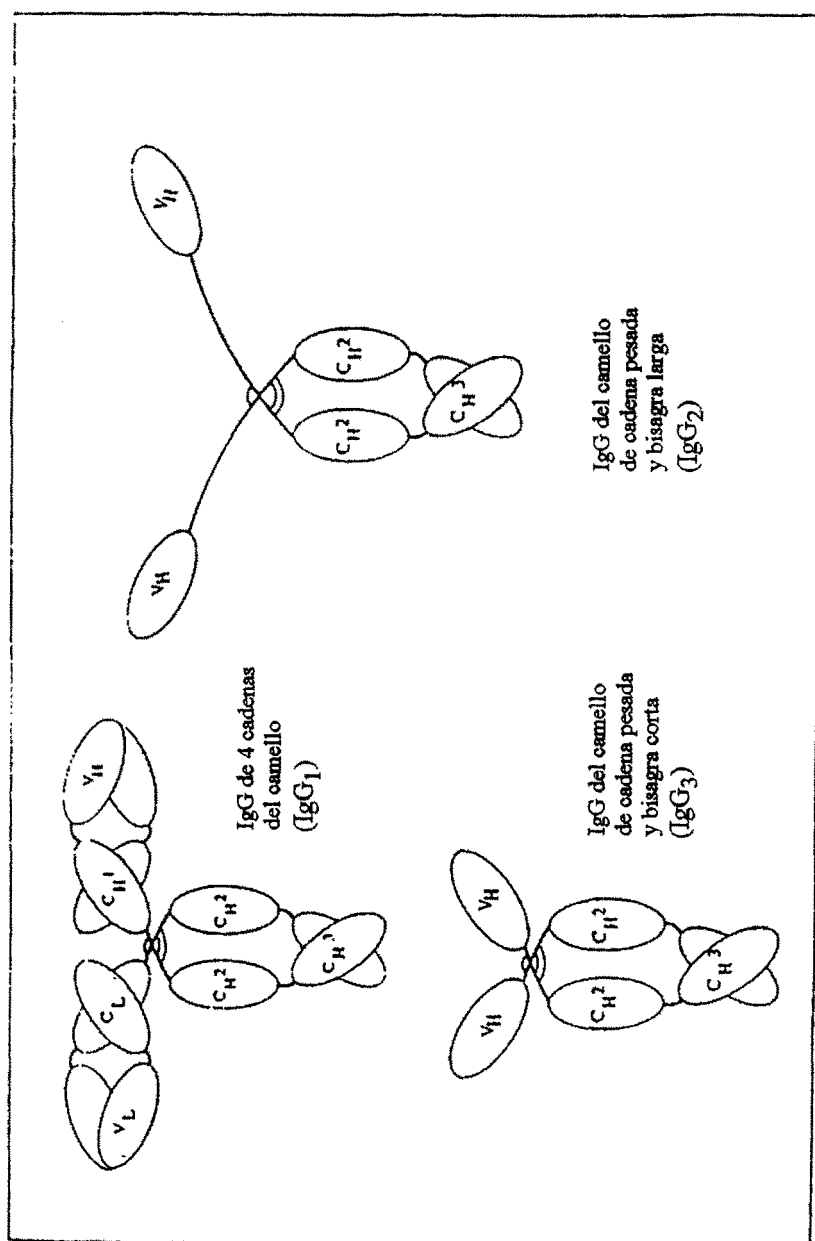


Fig 6: Una representación esquemática de las inmunoglobulinas IgG1, la supuesta IgG2 y la IgG3 del camello. El gran (Pro-X)12 de la supuesta molécula IgG2 puede modelarse en una repetición de 6 aminoácidos

```

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

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

DR01006 GA--TACAGTAATT---GTCCCCTCACTTG-6AGCTGGTATC6CCA6TTT
DR27006 AA--TATATGCCTT---GCACCTACGACAT-GACCTGGTACC6CCAAGGCT
DR03006 GA--TTCTCCTTTA---GTACCAATTGTAT-GGCCTGGTTCCGCCAAGGCT
DR11006 GC--TCTCCCACTA---GTACTTATTGCCT-6GGCTGGTTCCGCCAAGGCT
DR24006 GC--TCTCCCACTA---GTACTTATTGCCT-6GGCTGGTTCCGCCAAGGCT
DR16006 GA--TTCCGC-TCA---ATG6TTACTACAT-C6CCTGGTTCC6TCAAGGCT
DR19006 AC--TACACCATCA---CTGATTATTGCAT-6GCCTGGTTCCGCCAAGGCT
DR07006 GA--TACACGTACG---GTAGCTTCTGTAT-6GGCTGGTTCCGCCAAGGCT
DR16006 GA--TTCCCCTATA---GTACCTTCTGTCT-6GGGTGGTTCCGCCAAGGCT
DR20006 CT--CACACCGACA---GTAGCACCTGTAT-AGGCTGGTTCCGCCAAGGCT
DR25006 GA--TTGACTTTTG---ATGATTCTGACGT-6GGGTGGTACC6CCAGGCT
DR20006 GA--TTCAATTTTG---AACTTCTCGTAT-GGCCTGGTACC6CCAGGCT
DR21006 GAGGTACCCAGATCGTGTCTCTAAATCTTGGCCTGGTTCCGCCAAGGCT
DR09006 -----CAACGATACTGGGACCA-----TGGGATGGTTTCCGCCAAGGCT
DR17006 --GGGCCACCTACA---GTGACTACA6TATTGGA-TGGATCCGCCAAGGCT
DR13006 G-----ATACGTAT-CCT----CTATGGCCTGGTTCCGCCAAGGCT
DR02006 GAGA----CAGTTTCA6TAGATT--T6CCATGTCTTGGTTCCGCCAAGGCT

```

FIGURA 7A


```

DR01006 CCAGGAACGGAGCGCGAGTTCGTCTCCAATGATCCGGATGGAAATAC
DR27006 CCAGGCAAGGAGCGCGAATTTGTCTCAAGTATAAATATTGATGGTAAGAC
DR03006 TCAGGAAAGCAGCGTGAGGGGGTCCAGCCATTAAATAGTG6CGGTGGTAG
DR11006 CCAGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTCCAGCGATTAA-----CACTGATGG
DR24006 CCAGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTCCAGCGATTAA-----CACTGATGG
DR16006 CCTGGGAAGGGGGCGTGAGGGGGTCCGAACAATTAATGGTGGTCG-----
DR19006 CCAGGGAAGGAGCGTGAGTGGTCCAGCGATTCAAGTTGTCCGTAGTGA
DR07006 CCAGGCAAGGAACGTGAGGGGGATCGCAACTATTCTTAATGGTGGTACTAA
DR16006 CCAGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTCCGCGGGTATTAAATAGTGCAAGGAGGTAA
DR20006 CCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTCCGAAGTATATATTTTGGTGGTGGTGG
DR25006 CCAGGGCATGAGTGCAAAATGGTCTCAAGTATTCTGAGTGGTGGTACT-C
DR20006 CCAGGAAATGTGTGTGAGTTGGTCTCAAGTATTACAGTGGTGG-----
DR21006 CCAGAGAAGGAGCGCGAGGGGGATCGCAGTTCTTTGACTAAGGATGGTAA
DR09006 CCAGGGAAGAGTGCAGAAAGGGTCCGCGCATATTACGCTGATGGTATGA-
DR17006 CCAGGGAAGGACCCTGAAAGTATGCGAGCCGCTAATACTGGTG-----
DR13006 CCAGGGCAGGAGCGCGAGGGGGTCCGCTTTGTTCAAACGG-----
DR02006 CCAGGGAAGGAGTGGCAATTGGTCTCAAGCATTCAAAGTAATGGAAAGGAC

DR01006 CAAGTACA-----CATACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACC
DR27006 AACATACG-----CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR03006 GACATACTA-CAACACATATGTCGCCGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCCGCC
DR11006 CAGTATCAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR24006 CAGTGTCTAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR16006 -----CGA-CGTACATACTACGCCGACTCCGTGACGGGGCGATTTCACC
DR19006 TACT--CGC-C-TACAGACTACGCCGACTCCGTGAAGGGGACGATTCCACC
DR07006 -----CACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR16006 -----TACTTACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR20006 -----TACGAATTATCGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR25006 CATATACAAAGAGTGGAGACTATGCTGAGTCTGTGAGGGGGCCGGTTACC
DR20006 CA-AAACATACTACGTCGACC--GCA-----TGAAGGGCCGATTCCACC
DR21006 GA-----CATTCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR09006 -----CCTTCATTGATGAACCCGTGAAGGGGGCGATTTCACG
DR17006 -----CGACTAGTAAATCTACGTCGACTTTGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR13006 --CTGACAAT-AGTGCATTATATGGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC
DR02006 AACTGA-----GGCCGATTCCGTGCAAGGGCCGATTCCACC

DR01006 ATGTCCCAGGACAGCACCAGTACACAGTATTTCTGCAAATGGACAATCT
DR27006 ATCTCCCAAGACAGCGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCT
DR03006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGAACACGGTATATCTTGATATGAACAACCT
DR11006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGAACACGGTATATCTCCAGATGAACAACCT
DR24006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGAACACGGTATATCTCCAGATGAACAACCT
DR16006 ATCTCCCAAGACAGCCCCAAGAAATACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCT
DR19006 ATCTCCCAAGGCAACACCAAGAACACAGTGAATCTGCAAATGAACAGCCT
DR07006 ATCTCCCAAGGCAACACCAAGAACACAGTGAATCTGCAAATGAACAGCCT
DR16006 ATCTCCCAAGGGAATGCCAAGAAATACGGTGTATCTGCAAATGGATAACTT
DR20006 ATCTCCCAACTCAACGCCAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
DR25006 ATCTCCAGAGACAAACGCCAAGAACATGATATACCTTCAAATGAACGACCT
DR20006 ATTTCTAGAGAGAATGCCAAGAAATACATTGTATCTACAACCTGAGCGGCCT
DR21006 ATCTTCTTAGATAATGACAAGACCACTTTCTCCTTACAACCTTGATCGACT
DR09006 ATCTCCGAGACAAACGCCAGAAACCTTTGCTTTGCGAATGAATAGTCT
DR17006 ATTTCCCAAGACAAACGCCAAGAAATACGGTATATCTGCAAATGAGCTTCT
DR13006 ATCTCCACGACAAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGCGCAACCT
DR02006 ATCTCCGAGACAAATCCAGGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCT

```

FIGURA 7B

```

DR01006 GAAACCTGAGGACACGGC6AT6TATTACT6TAAAAC-A---GCCCTAC--
DR27006 GAAACCTGAGGACACGGC6AT6TATTACT6TAAAAT-A---GA--TTC--
DR03006 AACCCCTGAAGACACGGCTAC6TATTACT6TGC6GCGG---TCCAGCCC
DR11006 GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACT6C6C6GCAA---GACTGACGG
DR24006 GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACT6C6C6GCAA---GACTGACGG
DR16006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTACTTCT6TGCAGCAG---G-----CTC
DR19006 GACACCTGAGGACACGGCCATCTACA6T16TGC6GCAA---C-----CAG
DR07006 GAAACCTGAAGACACGGGACCTATTACT6T6CT6-CA---GAACTA6T
DR16006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACT6C6C6G-CG---GATA6TCCA
DR20006 GAAACCTGAGGACACG6CCAT6TACTACT6TGC6AATCA---CTGAAATTG
DR25006 GAAACCTGAGGACACGGCCAT6TATTACT6C6C6GTA6AT66TT66ACCC
DR20006 CAAACCTGAGGACACGGCCAT6TATTACT6T6CG-----CC
DR21006 GAACCCG6AGGACACTGCCGACTACTACT6C6CTGCAAATCAATTAGC--
DR09006 GAGGCTGAGGACACGGCC6T6TATTACT6T6C6GCA6ATTG-----
DR17006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACT6T6C6GCA6-----C66ACCC
DR13006 GCAACCTGAC6ACACT66C6T6TACTACT6T6C6G6C-----CAA
DR02006 GAAACCCGAGGACACGGCC6T6TATTACT6T6G6GCA6T-----

DR01006 -----A-AC--CT66666TTATT6T666TA-
DR27006 -----GTAC--CC6T6CCATCTCCTTGATG-
DR03006 ACTT666ACCT-----G6C6-CCATT-----CTT6ATTG
DR11006 AGAT6666GCTTGTGATGCGAGAT666CGACCTTAGC--GACAA66AC-6
DR24006 AGAT6666GCTTGTGATGCGAGAT666CGACCTTAGC--GACAA66AC-6
DR16006 GCGTTTTT-CTAGTCT6T6T66GAGCACTTC-TAGAC---TCGAAAGTAG
DR19006 TAGTTTTTACT66TACT-----6CAC-----C---ACG-----6
DR07006 G6T6GTAGTTGTGAATTGC---CTTT6C-----TATTTGACTA-----
DR16006 TGTACATGCCGACTATGC---CC6CTCCCCGATACGAGACAGTTTT66
DR20006 AGTGGTATGGGTGCAATTT---AAGGACTACTTTTACT---C-----G
DR25006 G6AAGGAA6--66GGAATC66GTTAC---CCTG6TCGGTCCAAT6TGAA
DR20006 GGTGAA-----TATC---CTATTGCAGAC--ATGT6TT
DR21006 ---TGGTGGCTGGTATT-----TGGACCCGAATTACT66-CTCTCT6T6
DR09006 ---GAAATACTG6A---CTT6T66T6C--CCAGA-CT66-----AG
DR17006 AAGTATATATTATAGTATC-----CTCCNNAT-----
DR13006 AAGAAGGATCGTA-----CTAGATGG6C-----CGAGCCT-----
DR02006 -----CTCCCTAA--T66ACCGAATTC

DR01006 --TGGGTANT6CCTCTG666CCA6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR27006 --T-----CTG666CCA6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR03006 AAAAAGTATAAGTACTG666CCA6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR11006 TTTGCGTATAACTACTG666CCG6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR24006 TTTGCGTATAACTACTG666CCG6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR16006 CGA-CT-ATAACTATTG666CCA6666ATCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR19006 CGC-CTTATAACGTCTG666GTCAG666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR07006 CTGGG-----6CCA666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR16006 CTGGGATGATTTT-----GGCCAG666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR20006 CTGGG-----6CCA666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR25006 GATGGTTATAACTATTG666GCA6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
DR20006 CGAGAT----ACG---6C6ACCCG666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
DR21006 GGTGCATATGCCATCTG666CCA6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
DR09006 GATACTTC6GACAG-TGG66GTCAG666GCCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
DR17006 --TGAGTATAAGTACTG666CCA6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCA--
DR13006 CGAGAATGGAACAACTG666GCA6666ACCCAGGTCACCGTCTCCTCA--
DR02006 CCAACATGG6--TGCCG666CCA666AACCAGGTCACCGTCTCCT----

```

FIGURA 7C

DR01006	AG----	TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR27006	AG----	TTACCCGTACGAGCTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR03006	AGCTAGTT	ACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR11006	AG----	TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR24006	A6CTAGTT	ACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR16006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR19006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR07006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR16006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR20006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR25006	---	TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR20006	---	TAGTTACCCGTACGACGAACCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR21006	---	TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR09006	A6CTAGTT	ACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR17006	-----	-----
DR13006	-----	-----
DR02006	-----	-----TA

FIGURA 7D

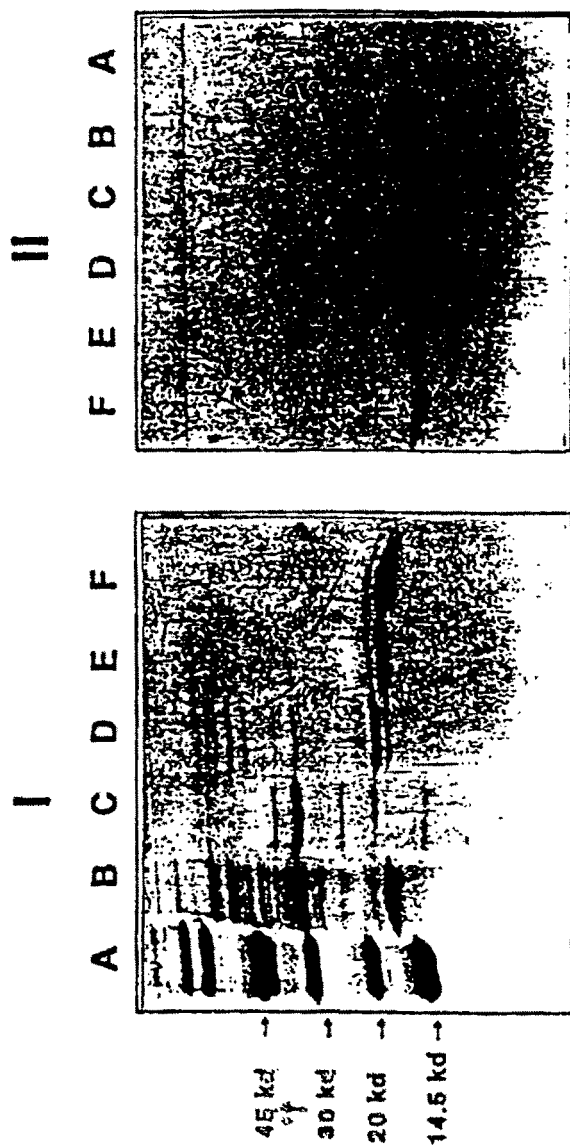


FIGURA 8A

FIGURA 8B

ES 2 338 791 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Vrije Universiteit Brussel

5 <120> Inmunoglobulinas desprovistas de cadenas ligeras

<150> EP 00127968.6

<151> 20-DEC-2000

10

<150> EP 93919098.9

<151> 18-AGOSTO-93

15

<150> PCT/EP 93/02214

<151> 18-AGOSTO-93

20

<150> EP 92402326.0

<151> 21-AGOSTO-1992

<150> EP 93401310.3

25

<151> 21-MAYO-1993

<160> 131

30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

35

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

40

<222> 1..22

<223> /etiqueta= ENTRAMADO 1

<400> 1

45

Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Ile
1				5					10					15	
Ser	Gly	Leu	Thr	Phe	Asp										
			20												

50

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

55

<220>

<221> Dominio

<222> 1..22

60

<223> /etiqueta= ENTRAMADO 1

<400> 2

65

Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val
1				5					10					15	
Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser										
			20												

ES 2 338 791 T3

<210> 3
 <211> 22
 <212> PRT
 5 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..22
 10 <223> /etiqueta= ENTRAMADO 1

 <400> 3
 15 Gly Gly Ser Glu Gln Gly Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Gly Tyr Thr Tyr Gly
 20

 20 <210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 25 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..22
 <223> /etiqueta= ENTRAMADO 1
 30
 <400> 4
 Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Val
 1 5 10 15
 Ser Gly Ala Thr Tyr Ser
 20

 40 <210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 45 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..22
 <223> /etiqueta= ENTRAMADO 1
 50
 <400> 5
 Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly
 1 5 10 15
 55 Ser Gly Phe Pro Tyr Ser
 20

 60 <210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 65 <222> 1..21
 <223> /etiqueta= ENTRAMADO 1

ES 2 338 791 T3

<400> 6

5 Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala
1 5 10 15
Gly Phe Gly Thr Ser
20

<210> 7

<211> 21

10 <212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

15 <221> Dominio

<222> 1..21

<223> /etiqueta= ENTRAMADO 1

20 <400> 7

Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ser
1 5 10 15
Phe Ser Pro Ser Ser
20

25

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

30 <213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

35 <222> 1..11

<223> /etiqueta= ENTRAMADO 4

<400> 8

40 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 9

<211> 11

45 <212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

50 <221> Dominio

<222> 1..11

<223> /etiqueta= ENTRAMADO 4

55 <400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

60

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

65 <213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

ES 2 338 791 T3

```

<222> 1..11
<223> /etiqueta= ENTRAMADO 4

5  <400> 10
      Trp Gly Gln Gly Ala Gln Val Thr Val Ser Ser
      1          5          10

10 <210> 11
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Camelus dromaderius

15 <220>
    <221> Dominio
    <222> 1..11
    <223> /etiqueta= ENTRAMADO 4

20 <400> 11
      Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Ala Ser Ser
      1          5          10

    <210> 12
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Camelus dromaderius
    <220>
    <221> Dominio
    <222> 1..11
    <223> /etiqueta= ENTRAMADO 4

35 <400> 12
      Arg-Gly Gln-Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Leu
      1          5          10

    <210> 13
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Camelus dromaderius

50 <220>
    <221> Dominio
    <222> 1..14
    <223> /etiqueta= CDR3

55 <400> 13
      Ala Leu Gln Pro Gly Gly Tyr Cys Gly Tyr Gly Xaa Cys Leu Trp Gly
      1          5          10          15
      Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      20          25

    <210> 14
    <211> 23
    <212> PRT
    <213> Camelus dromaderius

```


ES 2 338 791 T3

<220>

<221> Dominio

<222> 1..12

5 <223> /etiqueta= CDR3

<400> 14

	Val	Ser	Leu	Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Gln	His	Gly	Cys	Arg	Gly	Gln	Gly
10	1				5					10					15	
	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Leu									
					20											

<210> 15

15 <211> 29

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

20 <220>

<221> Dominio

<222> 1..18

<223> /etiqueta= CDR3

25

<400> 15

	Val	Pro	Ala	His	Leu	Gly	Pro	Gly	Ala	Ile	Leu	Asp	Leu	Lys	Lys	Tyr
	1				5					10					15	
30	Lys	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
				20					25							

<210> 16

35 <211> 26

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

40 <221> Dominio

<222> 1..15

<223> /etiqueta= CDR3

45 <400> 16

	Phe	Cys	Tyr	Ser	Thr	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Glu	Met	Tyr	Trp
	1				5					10					15	
	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
50				20					25							

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

55 <213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

60 <222> 1..15

<223> /etiqueta= CDR3

65

ES 2 338 791 T3

<400> 17

	Glu	Leu	Ser	Gly	Gly	Ser	Cys	Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp
	1				5				10					15		
5	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
				20					25							

<210> 18
 <211> 28
 10 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 15 <222> 1..17
 <223> /etiqueta= CDR3

<400> 18

	Asp	Trp	Lys	Tyr	Trp	Thr	Cys	Gly	Ala	Gln	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe	Gly
	1				5					10					15	
	Gln	Trp	Gly	Gln	Gly	Ala	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
				20					25							

<210> 19
 <211> 35
 <212> PRT
 30 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..24
 35 <223> /etiqueta= CDR3

<400> 19

	Arg	Leu	Thr	Glu	Met	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	Arg	Trp	Ala	Thr	Leu	Ala
	1				5					10					15	
	Thr	Arg	Thr	Phe	Ala	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr
				20					25					30		
	Val	Ser	Ser													
															35	

<210> 20
 <211> 27
 <212> PRT
 50 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..16
 55 <223> /etiqueta= CDR3

<400> 20

	Gln	Lys	Lys	Asp	Arg	Thr	Arg	Trp	Ala	Glu	Pro	Arg	Glu	Trp	Asn	Asn
	1				5					10					15	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Ala	Ser	Ser					
				20					25							

<210> 21
 <211> 32

ES 2 338 791 T3

<212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 5 <221> Dominio
 <222> 1..21
 <223> /etiqueta= CDR3
 10 <400> 21
 Gly Ser Arg Phe Ser Ser Pro Val Gly Ser Thr Ser Arg Leu Glu Ser
 1 5 10 15
 Ser Asp Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Ala Ser Ser
 20 25 30
 15
 <210> 22
 <211> 27
 20 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 25 <222> 1..16
 <223> /etiqueta= CDR3
 <400> 22
 30 Ala Asp Pro Ser Ile Tyr Tyr Ser Ile Leu Xaa Ile Glu Tyr Lys Tyr
 1 5 10 15
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 20 25
 35
 <210> 23
 <211> 33
 <212> PRT
 40 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..22
 45 <223> /etiqueta= CDR3
 <400> 23
 50 Asp Ser Pro Cys Tyr Met Pro Thr Met Pro Ala Pro Pro Ile Arg Asp
 1 5 10 15
 Ser Phe Gly Trp Asp Asp Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 20 25 30
 Ser
 55 <210> 24
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 60 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..15
 65 <223> /etiqueta= CDR3

ES 2 338 791 T3

<400> 24

	Thr	Ser	Ser	Phe	Tyr	Trp	Tyr	Cys	Thr	Thr	Ala	Pro	Tyr	Asn	Val	Trp
	1				5				10					15		
5	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
				20					25							

<210> 25

<211> 27

10 <212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

15 <221> Dominio

<222> 1..16

<223> /etiqueta= CDR3

20 <400> 25

	Thr	Glu	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gly	Cys	Asn	Leu	Arg	Thr	Thr	Phe	Thr	Arg
	1				5					10				15		
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
25				20					25							

<210> 26

<211> 33

30 <212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

35 <222> 1..22

<223> /etiqueta= CDR3

<400> 26

	Asn	Gln	Leu	Ala	Gly	Gly	Trp	Tyr	Leu	Asp	Pro	Asn	Tyr	Trp	Leu	Ser
	1				5				10					15		
	Val	Gly	Ala	Tyr	Ala	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	His	Val	Thr	Val	Ser
				20				25					30			
45	Ser															

<210> 27

<211> 35

<212> PRT

50 <213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

55 <222> 1..24

<223> /etiqueta= CDR3

<400> 27

	Arg	Leu	Thr	Glu	Met	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	Arg	Trp	Ala	Thr	Leu	Ala
	1				5					10				15		
	Thr	Arg	Thr	Phe	Ala	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Gln	Val	Thr
				20					25					30		
60	Val	Ser	Ser													
65				35												

ES 2 338 791 T3

<210> 28

<211> 35

<212> PRT

5 <213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

10 <222> 1..24

<223> /etiqueta= CDR3

<400> 28

```

15      Asp Gly Trp Thr Arg Lys Glu Gly Gly Ile Gly Leu Pro Trp Ser Val
        1          5          10          15
        Gln Cys Glu Asp Gly Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
          20          25          30
        Val Ser Ser
          35

```

20

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

25 <213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

30 <222> 1..10

<223> /etiqueta= CDR3

<400> 29

```

35      Asp Ser Tyr Pro Cys His Leu Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln
        1          5          10          15
        Val Thr Val Ser Ser
          20

```

40

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

45 <213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

<222> 1..12

50 <223> /etiqueta= CDR3

<400> 30

```

55      Val Glu Tyr Pro Ile Ala Asp Met Cys Ser Arg Tyr Gly Asp Pro Gly
        1          5          10          15
        Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
          20

```

<210> 31

60 <211> 27

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

65 <221> Dominio

<222> 1..27

ES 2 338 791 T3

<223> /etiqueta= CH2

<400> 31

```

5      Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Thr Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
      1          5          10          15
      Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Thr Leu Thr Pro
                20          25

```

10 <210> 32

<211> 27

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

15 <220>

<221> Dominio

<222> 1..27

20 <223> /etiqueta= CH2

<400> 32

```

25      Ala Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Thr Lys
      1          5          10          15
      Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
                20          25

```

<210> 33

30 <211> 27

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

35 <220>

<221> Dominio

<222> 1..27

<223> /etiqueta= CH2

40

<400> 33

```

45      Ala Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Pro Lys
      1          5          10          15
      Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
                20          25

```

<210> 34

50 <211> 27

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

55 <221> Dominio

<222> 1..27

<223> /etiqueta= CH2

60 <400> 34

```

65      Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
      1          5          10          15
      Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
                20          25

```

ES 2 338 791 T3

<210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..12
 10 <223> /etiqueta= CH3

 <400> 35
 15 **Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ala**
 1 5 10

 <210> 36
 20 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 25 <221> Dominio
 <222> 1..18
 <223> /etiqueta= CH3

 30 <400> 36
 Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ala Pro Xaa Arg Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu
 35

 <210> 37
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Región
 45 <222> 1..12
 <223> /etiqueta= bisagra

 <400> 37
 50 **Gly Thr Asn Glu Val Cys Lys Cys Pro Lys Cys Pro**
 1 5 10

 <210> 38
 55 <211> 35
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 60 <221> Región
 <222> 1..35
 <223> /etiqueta= bisagra
 65

ES 2 338 791 T3

<400> 38

	Glu	Pro	Lys	Ile	Pro	Gln	Pro	Gln	Pro	Lys	Pro	Gln	Pro	Gln	Pro	Gln
	1				5				10				15			
5	Pro	Gln	Pro	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Pro	Glu	Cys	Thr	Cys	Pro
				20				25					30			
	Lys	Cys	Pro													
				35												

<210> 39

10 <211> 28

<212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

15 <220>

<221> Dominio

<222> 1..28

<223> /etiqueta= CH2

20 <400> 39

	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Val	Phe	Pro	Pro	Lys
	1				5					10					15	
25	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Ser	Ile	Ser	Gly	Xaa	Pro	Lys				
				20				25								

<210> 40

<211> 28

30 <212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

35 <221> Dominio

<222> 1..28

<223> /etiqueta= CH2

40 <400> 40

	Ala	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Val	Phe	Pro	Thr	Lys
	1				5					10					15	
	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Ser	Ile	Ser	Gly	Arg	Pro	Lys				
45				20				25								

<210> 41

<211> 28

50 <212> PRT

<213> *Camelus dromaderius*

<220>

<221> Dominio

55 <222> 1..28

<223> /etiqueta= CH2

<400> 41

	Ala	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Val	Phe	Pro	Pro	Lys
	1				5					10					15	
	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Ser	Ile	Ser	Gly	Arg	Pro	Lys				
65																

20 25

ES 2 338 791 T3

<210> 42
 <211> 28
 <212> PRT
 5 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..28
 10 <223> /etiqueta= CH2

 <400> 42
 15 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro Lys
 20 25

 20 <210> 43
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 25 <400> 43
 Val Thr Val Ser Ser Gly Thr Asn Glu Val Cys Lys Cys Pro Lys Cys
 1 5 10 15
 30 Pro Ala Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro
 20 25 30

 <210> 44
 35 <211> 54
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 40 <221> Región
 <222> 1..54
 <223> /etiqueta= bisagra

 45 <400> 44
 Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ile Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Glu Pro
 20 25 30
 50 Glu Cys Thr Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 35 40 45
 Ser Val Phe Ile Phe Pro
 50

 55 <210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 60 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Región
 <222> 1..14
 65 <223> /etiqueta= bisagra
 <220>
 <221> Dominio

ES 2 338 791 T3

<222> 1..14
 <223> /etiqueta= CH2

5 <400> 45
 Ala Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro
 1 5 10

10 <210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*

15 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..14
 <223> /etiqueta= CH2

20 <400> 46
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10

25 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

30 <400> 47
 35 cgccatcaag gtaacagttg a 21

40 <210> 48
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12..17

50 <223> /etiqueta= sitio XhoI /nota= "Sitio de restricción"

<400> 48

55 aggtccagct gctcgagtct gg 22

<210> 49
 <211> 22
 60 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

65 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 338 791 T3

<222> 12..17
 <223> /etiqueta= sitio XhoI /nota= "Sitio de restricción"

5 <400> 49
 agctccagct gctcgagtct gg 22

10 <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
 <220>
 <221> misc_feature

20 <222> 12..17
 <223> /etiqueta= sitio XhoI /nota= "Sitio de restricción"

25 <400> 50
 aggtccagct tctcgagtct gg 22

30 <210> 51
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligonucleótido

40 <400> 51
 tcttaactag tgaggagacg gtgacctg 28

45 <210> 52
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
 <220>
 <221> misc_feature

55 <222> 1..5
 <223> /etiqueta= SpeI

60 <400> 52
 ctagtgcacc accatcacca tcactaatag 30

65 <210> 53
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

ES 2 338 791 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
<221> misc_feature
5 <222> 1..30
<223> /nota= "Secuencia complementaria a SEQ ID NO: 52"
<220>
10 <221> misc_feature
<222> 26..30
<223> /etiqueta= EcoRI
15 <400> 53
acgtgggtgt agtgtagtg attatcttaa
30
<210> 54
<211> 43
<212> PRT
<213> *Camelus dromedarius*
25 <220>
<221> Dominio
<222> 1..25
<223> /etiqueta= CH2
30 <220>
<221> Dominio
<222> 26..43
35 <223> /etiqueta= CH3
<400> 54
Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
1 5 10 15
Val Leu Ser Ile Xaa Gly Xaa Pro Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln
20 25 30
Val Tyr Thr Leu Ala Pro Xaa Arg Leu Glu Leu
35 40
45 <210> 55
<211> 24
<212> PRT
50 <213> *Camelus dromedarius*
<220>
<221> Dominio
<222> 1..24
55 <223> /etiqueta= CH2 /nota= "Clon #72/1"
<400> 55
60 Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Thr Lys Pro Lys Asp
1 5 10 15
Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
20
65 <210> 56
<211> 24
<212> PRT

ES 2 338 791 T3

<213> *Camelus dromedarius*

<220>

<221> Dominio

5 <222> 1..24

<223> /etiqueta= CH2

<400> 56

10 Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
 20

15 <210> 57

<211> 24

<212> PRT

20 <213> *Camelus dromedarius*

<220>

<221> Dominio

<222> 1..24

25 <223> /etiqueta= CH2

<400> 57

30 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
 20

35 <210> 58

<211> 30

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

40 <220>

<221> Dominio

<222> 1..30

45 <223> /etiqueta= ENTRAMADO 1

<400> 58

50 Asp Val Gln Leu Val Ala Ser Gly Gly Gly Ser Val Gly Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Asp Ser Phe Ser
 20 25 30

<210> 59

55 <211> 11

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

<220>

60 <221> Dominio

<222> 1..11

<223> /etiqueta= ENTRAMADO 4

65

ES 2 338 791 T3

<400> 59

Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 <210> 60
<211> 11
<212> PRT
10 <213> *Camelus dromedarius*
<220>
<221> Dominio
<222> 1..11
15 <223> /etiqueta= ENTRAMADO 4

<400> 60

20 Trp Gly Gln Gly Thr His Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 61
<211> 11
25 <212> PRT
<213> *Camelus dromedarius*
<220>
30 <221> Dominio
<222> 1..11
<223> /etiqueta= ENTRAMADO 4

35 <400> 61

Trp Gly Gln Gly Ile Gln Val Thr Ala Ser Ser
1 5 10

40 <210> 62
<211> 14
<212> PRT
45 <213> *Camelus dromedarius*
<220>
<221> Región
<222> 1..14
50 <223> /etiqueta= VH
<220>
<221> Dominio
<222> 1..14
55 <223> /etiqueta= CDR3

<400> 62

60 Ala Leu Gln Pro Gly Gly Tyr Cys Gly Tyr Gly Xaa Cys Leu
1 5 10

<210> 63
65 <211> 12
<212> PRT
<213> *Camelus dromedarius*

ES 2 338 791 T3

<220>
 <221> Región
 <222> 1..12
 5 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..12
 10 <223> /etiqueta= CDR3
 <220>
 <400> 63

	Val	Ser	Leu	Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Gln	His	Gly	Cys
	1				5					10		

<210> 64
 20 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromedarius*
 <220>
 25 <221> Región
 <222> 1..18
 <223> /etiqueta= VH
 30 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..18
 <223> /etiqueta= CDR3
 35 <220>
 <400> 64

	Val	Pro	Ala	His	Leu	Gly	Pro	Gly	Ala	Ile	Leu	Asp	Leu	Lys	Lys	Tyr
	1				5					10					15	
40	Lys	Tyr														

<210> 65
 <211> 15
 45 <212> PRT
 <213> *Camelus bactrianus*
 <220>
 <221> Región
 50 <222> 1..15
 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 55 <221> Dominio
 <222> 1..15
 <223> /etiqueta= CDR3
 <220>
 60 <400> 65

	Phe	Cys	Tyr	Ser	Thr	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Glu	Met	Tyr
	1				5					10					15

65 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 338 791 T3

```

<213> Camelus dromedarius
<220>
<221> Región
5 <222> 1..15
<223> /etiqueta= VH
<220>
10 <221> Dominio
<222> 1..15
<223> /etiqueta= CDR3

15 <400> 66
      Glu Leu Ser Gly Gly Ser Cys Glu Leu Pro Leu Leu Phe Asp Tyr
      1           5           10           15

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Camelus dromaderius
25 <220>
<221> Región
<222> 1..17
<223> /etiqueta= VH
30 <220>
<221> Dominio
<222> 1..17
35 <223> /etiqueta= CDR3

<400> 67
      Asp Trp Lys Tyr Trp Thr Cys Gly Ala Gln Thr Gly Gly Tyr Phe Gly
40      1           5           10           15
      Gln

<210> 68
<211> 24
45 <212> PRT
<213> Camelus dromaderius
<220>
50 <221> Región
<222> 1..24
<223> /etiqueta= VH
<220>
55 <221> Dominio
<222> 1..24
<223> /etiqueta= CDR3

60 <400> 68
      Arg Leu Thr Glu Met Gly Ala Cys Asp Ala Arg Trp Ala Thr Leu Ala
      1           5           10           15
      Thr Arg Thr Phe Ala Tyr Asn Tyr
65      20

```


ES 2 338 791 T3

<210> 69
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="synthetic construct"
 <220>
 <221> Región
 <222> 1..16
 15 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..16
 20 <223> /etiqueta= CDR3
 <400> 69
 25 Gln Lys Lys Asp Arg Thr Arg Trp Ala Glu Pro Arg Glu Trp Asn Asn
 1 5 10 15
 <210> 70
 30 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 35 <221> fuente
 <223> /nota="synthetic construct"
 <220>
 40 <221> Región
 <222> 1..21
 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 45 <221> Dominio
 <222> 1..21
 <223> /etiqueta= CDR3
 50 <400> 70
 Gly Ser Arg Phe Ser Ser Pro Val Gly Ser Thr Ser Arg Leu Glu Ser
 1 5 10 15
 55 Ser Asp Tyr Asn Tyr
 20
 <210> 71
 <211> 16
 60 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 65 <221> Región
 <222> 1..16
 <223> /etiqueta= VH

ES 2 338 791 T3

<220>
 <221> Dominio
 <222> 1..16
 5 <223> /etiqueta= CDR3

 <400> 71

 10 Ala Asp Pro Ser Ile Tyr Tyr Ser Ile Leu Xaa Ile Glu Tyr Lys Tyr
 1 5 10 15

 <210> 72
 <211> 22
 15 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 20 <221> Región
 <222> 1..22
 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 25 <221> Dominio
 <222> 1..22
 <223> /etiqueta= CDR3

 30 <400> 72

 Asp Ser Pro Cys Tyr Met Pro Thr Met Pro Ala Pro Pro Ile Arg Asp
 1 5 10 15
 35 Ser Phe Gly Trp Asp Asp
 20

 <210> 73
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 <221> Región
 45 <222> 1..15
 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 50 <221> Dominio
 <222> 1..15
 <223> /etiqueta= CDR3

 55 <400> 73

 Thr Ser Ser Phe Tyr Trp Tyr Cys Thr Thr Ala Pro Tyr Asn Val
 1 5 10 15

 60 <210> 74
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 65 <220>
 <221> Región

ES 2 338 791 T3

<222> 1..16
 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 5 <221> Dominio
 <222> 1..16
 <223> /etiqueta= CDR3
 10 <400> 74
 Thr Glu Ile Glu Trp Tyr Gly Cys Asn Leu Arg Thr Thr Phe Thr Arg
 1 5 10 15
 15 <210> 75
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 20 <220>
 <221> Región
 <222> 1..22
 25 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..22
 30 <223> /etiqueta= CDR3
 <400> 75
 35 **Asn Gln Leu Ala Gly Gly Trp Tyr Leu Asp Pro Asn Tyr Trp Leu Ser**
 1 5 10 15
 Val Gly Ala Tyr Ala Ile
 20
 40 <210> 76
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 45 <220>
 <221> Región
 <222> 1..24
 <223> /etiqueta= VH
 50 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..24
 55 <223> /etiqueta= CDR3
 <400> 76
 Arg Leu Thr Glu Met Gly Ala Cys Asp Ala Arg Trp Ala Thr Leu Ala
 60 **1 5 10 15**
 Thr Arg Thr Phe Ala Tyr Asn Tyr
 20
 65 <210> 77
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*

ES 2 338 791 T3

<220>
 <221> Región
 <222> 1..24
 5 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..24
 10 <223> /etiqueta= CDR3

 <400> 77
 15 **Asp Gly Trp Thr Arg Lys Glu Gly Gly Ile Gly Leu Pro Trp Ser Val**
 1 5 10 15
 Gln Cys Glu Asp Gly Tyr Asn Tyr
 20

 20 <210> 78
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 25 <220>
 <221> Región
 <222> 1..10
 30 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 <221> Dominio
 <222> 1..10
 35 <223> /etiqueta= CDR3

 <400> 78
 40 **Asp Ser Tyr Pro Cys His Leu Leu Asp Val**
 1 5 10

 <210> 79
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> *Camelus dromaderius*
 <220>
 50 <221> Región
 <222> 1..12
 <223> /etiqueta= VH
 <220>
 55 <221> Dominio
 <222> 1..12
 <223> /etiqueta= CDR3

 60 <400> 79
 Val Glu Tyr Pro Ile Ala Asp Met Cys Ser Arg Tyr
 1 5 10

 65 <210> 80
 <211> 26

ES 2 338 791 T3

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

5 <400> 80

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly						
			20					25							

10

<210> 81

<211> 14

<212> PRT

15 <213> *Camelus dromedarius*

<400> 81

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser
1				5				10					

20

<210> 82

<211> 32

25 <212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

<400> 82

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5				10						15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

35 <210> 83

<211> 37

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

40

<400> 83

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Thr	Asn	Glu	Val
1				5					10					15	
Cys	Lys	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Val	Phe	Val	Phe	Pro											
			35												

50 <210> 84

<211> 18

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

55

<400> 84

Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ile
1				5				10						15	
Ser	Gly														

60

<210> 85

<211> 14

65 <212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

ES 2 338 791 T3

<400> 85

Trp Phe Arg Glu Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile Ala
1 5 10

5

<210> 86

<211> 32

<212> PRT

10 <213> *Camelus dromedarius*

<400> 86

Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Ser Thr Leu Lys Thr Met Tyr Leu Leu
15 5 10 15
Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala

20 25 30

20

<210> 87

<211> 60

<212> PRT

25 <213> *Camelus dromedarius*

<400> 87

30 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ile Pro
1 5 10 15
Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro
20 25 30
Gln Pro Lys Pro Glu Pro Glu Cys Thr Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro
35 35 40 45
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
50 55 60

40

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

45 <400> 88

Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser
1 5 10 15
Ser Ser

50

<210> 89

<211> 14

<212> PRT

55 <213> *Camelus dromedarius*

<400> 89

60 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser
1 5 10

<210> 90

<211> 32

65 <212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

ES 2 338 791 T3

<400> 90

```

      Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
      1           5           10           15
5      Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Lys Ile
           20           25           30

```

<210> 91

10 <211> 37

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

15 <400> 91

```

      Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Thr Asn Glu Val
      1           5           10           15
20     Cys Lys Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser
           20           25           30
      Val Phe Val Phe Pro
           35

```

<210> 92

25 <211> 400

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

30

<400> 92

```

      ctcgagtctg ggggaggatc ggtgcaggct ggaggggtctc tgagactctc gtgcgcagcc 60
      tcttgataca gtaattgtcc cctcacttgg agctgggtatc gccagtttcc aggaacggag 120
35     cgcgagtctg tctccagtat ggatccggat ggaaatacca agtacacata ctccgtgaag 180
      ggccgcttca ccatgtcccg aggcagcacc gagtacacag tatttctgca aatggacaat 240
      ctgaaacctg aggacacggc gatgtattac tgtaaaacag ccctacaacc tgggggttat 300
      tgtgggtatg ggtantgcct ctggggccag gggaccagcgc tcaccgtctc ctccactagt 360
40     acccgtagca cgttccggac tacggttctt aatagaattc 400

```

<210> 93

<211> 391

45 <212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

<400> 93

50

```

      ctcgagtctg ggggaggctc ggtgcaggct ggaggggtctc tgagactctc ctgtgcatct 60
      tcttctaaat atatgccttg cacctacgac atgacctggt accgccaggc tccaggcaag 120
      gagcggaat ttgtctcaag tataaatatt gatggtaaga caacatacgc agactccgtg 180
55     aagggccgat tcaccatctc ccaagacagc gccagaaga cgggtgtatct gcagatgaac 240
      agcctgaaac ctgaggacac ggcgatgtat tactgtaaaa tagattcgta cccgtgccat 300
      ctccctgatg tctggggcca ggggaccagc gtcaccgtct cctcactagt taccggtacg 360
      agcttccgga ctacggttct taatagaatt c 391

```

<210> 94

60 <211> 443

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

65

ES 2 338 791 T3

<400> 94

```

cagggtgaaac tgctcgagtc tggaggaggc tcggtgcaga ctggaggatc tctgagactc 60
tcctgtgcag tctctggatt ctcccttagt accagttgta tggcctgggt ccgccagggt 120
5  tcaggaaaagc agcgtgaggg ggtcgcagcc attaatagtg gcggtggtag gacatactac 180
aacacatatg tcgccgagtc cgtgaagggc cgattcgcca tctcccaaga caacgccaaag 240
accacgggat atcttgatat gaacaaccta acccctgaag acacggctac gtattactgt 300
gcggcggtcc cagccactt gggacctggc gccattcttg atttgaaaaa gtataagtac 360
tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc tcactagcta gttaccctga cgacgttccg 420
10 gactacgggt cttaatagaa ttc 443

```

<210> 95

<211> 433

<212> ADN

15 <213> *Camelus dromaderius*

<400> 95

```

20  ctcgagtcctg ggggagggtc ggtgcaggct ggagggtctc tgagactctc ctgtaatgtc 60
tctggctctc ccagtagtac ttattgcctg ggctgggtcc gccaggctcc agggagggag 120
cgtgaggggg tcacagcgat taacactgat ggcagtatca tatacgagc cgactccgtg 180
aagggccgat tcaccatctc ccaagacacc gccaaaggaa cggtagatct ccagatgaac 240
aacctgcaac ctgaggatac ggccacctat tactgcgcgg caagactgac ggagatgggg 300
25  gcttgatg cgagatgggc gaccttagcg acaaggacgt ttgcgtataa ctactggggc 360
cgggggaccc aggtcacctg ctctcacta gttaccctga cgacgttccg gactacgggt 420
cttaatagaa ttc 443

```

<210> 96

30 <211> 449

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

35 <400> 96

```

caggtgaaac tgctcgagtc tgggggaggg tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
tcctgtaatg tctctggctc tcccagtagt acttattgct tgggctgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg agcgtgaggg ggtcacagcg attaacactg atggcagtgat catatacgca 180
40  gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccaagaca ccgccaaaga aacggtatat 240
ctccagatga acaacctgca acctgaggat acggccacct attactgcgc ggcaagactg 300
acggagatgg gggcttgtga tgcgagatgg gcgaccttag cgacaaggac gtttgcgtat 360
aactactggg gccgggggac ccaggtcacc gtctcctcac tagctagtta cccgtacgac 420
gttcgggact acggttctta atagaattc 449

```

45 <210> 97

<211> 424

<212> ADN

50 <213> *Camelus dromaderius*

<400> 97

```

55  ctcgagtcctg gaggaggctc ggcgcaggct ggaggatctc tgagactctc ctgtgcagcc 60
cacgggattc cgctcaatgg ttactacatc gcctgggtcc gtcaggctcc tgggaagggg 120
cgtgaggggg tcgcaacaat taatggtggg cgcgacgta catactacgc cgactccgtg 180
acgggccgat ttaccatctc ccgagacagc cccaagaata cgggtgatct gcagatgaac 240
agcctgaaac ctgaggacac ggccatctac ttctgtgcag caggctcgcg ttttctagt 300
cctgttggga gcacttctag actcgaaagt agcgactata actattgggg ccagggggac 360
60  caggtcaccg tcacctcact agttaccctg acgacgttcc ggactacggg tcttaataga 420
attc 449

```

<210> 98

<211> 415

65 <212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

ES 2 338 791 T3

<400> 98

```
ctcagagtctg gaggaggctc ggttcaggct ggagggtccc ttagactctc ctgtgcagcc 60
tctgactaca ccatcactga ttattgcatg gcctgggtcc gccaggctcc agggaggag 120
cgtgaattgg tcgcagcgat tcaagttgtc cgtagtata ctcgcctcac agactacgcc 180
gactccgtga agggagcatt caccatctcc caaggcaaca ccaagaacac agtgaatctg 240
caaatgaaca gcctgacacc tgaggacacg gccatctaca gttgtgcggc aaccagtagt 300
ttttactggg actgcaccac ggcgccttat aacgtctggg gtcaggggac ccagggtcacc 360
gtctcctcac tagttaccg tacgacgttc cggactacgg ttcttaatag aattc 415
```

<210> 99

<211> 406

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

<400> 99

```
ctcagagtctg ggggaggctc ggtgcagggt ggagggtctc tgagactctc ctgtgcaatc 60
tctggatata cgtacggtag cttctgtatg ggctgggtcc gcgagggtcc aggcaaggaa 120
cgtgagggga tcgcaactat tcttaattgg ggtactaaca catactatgc cgactcggtg 180
aagggccgat tcaccatctc ccaagacagc acgttgaaga cgatgtatct gctaataaac 240
aacctgaaac ctgaagacac gggcacctat tactgtgctg cagaactaag tgggtgtagt 300
tgtgaattgc ctttgcattt tgactactgg ggccagggca cccagggtcac cgtctcctca 360
ctagttaccc gtacgacgtt ccggactacg gttcttaata gaattc 406
```

<210> 100

<211> 427

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

<400> 100

```
ctcagagtctg ggggaggctc ggtgcagggt ggagggtctc tgagactctc ctgtacaggc 60
tctggattcc cctatagtag cttctgtctg ggggtgggtcc gccagggtcc agggaggag 120
cgtgaggggg tcgcgggtat taatagtgtc ggaggtaata cttactatgc cgacgccgtg 180
aagggccgat tcaccatctc ccaagggaat gccagaata cgggtgttct gcaaatggat 240
aacttgaaac ctgaggacac ggccatctat tactgcgcgg cggatagtcc atgttacatg 300
ccgactatgc ccgtccccc gatacgagac agttttggct gggatgattt tggccagggg 360
accagggtca ccgtctctc actagttacc cgtacgacgt tccggactac ggttcttaat 420
agaattc 427
```

<210> 101

<211> 409

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

<400> 101

```
ctcagagtcag ggggaggctc ggtacagggt ggagggtctc tgagactctc ctgtgtagcc 60
tctactcaca ccgacagtag cacctgtata ggctgggtcc gccagggtcc agggaggag 120
cgcgaggggg tcgcaagtat atattttggg gatggtggtc cgaattatcg cgactccgtg 180
aagggccgat tcaccatctc ccaactcaac gccagaaca cagtgtatct gcaaatgaac 240
agcctgaaac ctgaggacag cgccatgtac tactgtgcaa tcaactgaaat tgagtggat 300
gggtgcaatt taaggactac ttttactcgc tggggccagg ggaccagggt caccgtctcc 360
tcactagtta cccgtacgac gttccggact acggttctta atagaattc 409
```

<210> 102

<211> 445

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

ES 2 338 791 T3

<400> 102

```

ctcagagtctg ggggaggctc ggtacaaact ggagggtctc tgagactctc ttgcgaaatc 60
tctggattga cttttgatga ttctgacgtg ggggtggtacc gccaggctcc aggggatgag 120
tgcaaatgg tctcaggtat tctgagtgat ggtactccat atacaaagag tggagactat 180
gctgagtctg tgagggggccg ggttaccatc tccagagaca acgccaagaa catgatatac 240
cttcaaatga acgacctgaa acctgaggac acggccatgt attactgctc ggtagatggt 300
tggacccgga aggaaggggg aatcggttta ccctggtcgg tccaatgtga agatggttat 360
aactattggg gccaggggac ccaggtcacc gtctcctcac tagttaccgc tacgacgttc 420
cggactacgg ttcttaatag aattc 445

```

<210> 103
<211> 394
<212> ADN
<213> *Camelus dromaderius*

<400> 103

```

ctcagagtctg gaggaggctc ggtgcaggct ggagggtctc tgagactctc ctgtgtagcc 60
tctggattca atttcgaaac ttctcgtatg gcgtggtacc gccagactcc aggaaatgtg 120
tgtgagttgg tctcaagtat ttacagtgat ggcaaaacat actacgtcga ccgcatgaag 180
ggccgattca ccatcttctag agagaatgcc aagaatacat tgtatctaca actgagcggc 240
ctcaaacctg aggacacggc catgtattac tgtgcgccgg ttgaatatcc tattgcagac 300
atgtgttcga gatacggcga cccggggacc caggtcaccg tctcctcact agttaccctg 360
acgacgaacc ggactacggt tcttaataga attc 394

```

<210> 104
<211> 433
<212> ADN
<213> *Camelus dromaderius*

<400> 104

```

ctcagagtctg ggggaggctc ggtgcagggt ggagggtctc tgaaactctc ctgtaaaatc 60
tcttgaggta ccccgatcgc tgttcctaaa tctttggcct ggttcgcgca ggctccagag 120
aaggagcgcg aggggatcgc agttctttcg actaaggatg gtaagacatt ctatgccgac 180
tccgtgaagg gccgattcac catcttctta gataatgaca agaccacttt ctccttaca 240
cttgatcgac tgaaccggga ggacactgcc gactactact gcgctgcaaa tcaattagct 300
ggtggctggt atttggaacc gaattactgg ctctctgtgg gtgcatatgc catctggggc 360
caggggaccc aggtcaccgt ctctcacta gttaccgta cgacgttccg gactacggtt 420
cttaatagaa ttc 433

```

<210> 105
<211> 416
<212> ADN
<213> *Camelus dromaderius*

<400> 105

```

cagggtgaaac tgctcagatc tgggggaggc tcggtgcagg ctgggggggc tctgacactc 60
tcttgtgtat acaccaacga tactgggacc atgggatggt ttcgccaggc tccagggaaa 120
gagtgcgaaa gggctgcgca tattacgcct gatggatga ccttcattga tgaaccctg 180
aaggggcgat tcacgatctc ccgagacaac gccagaaaaa cggttgtctt gcgaatgaat 240
agtctgaggc ctgaggacac ggccgtgtat tactgtgcgg cagattggaa atactggact 300
tgtggtgccc agactggagg atacttcgga cagtgggggc agggggccca ggtcaccgtc 360
tcctcactag ctagttaccc gtacgacgtt ccggactacg gttcttaata gaattc 416

```

<210> 106
<211> 361
<212> ADN
<213> *Camelus dromaderius*

ES 2 338 791 T3

<400> 106

```
ctcgagtcctg ggggaggctc ggtccaacct ggaggatctc tgacactctc ctgtacagtt 60
tctggggcca cctacagtga ctacagtatt ggatggatcc gccaggctcc agggaaaggac 120
cgtgaagtag tgcagccgc taatactggt gcgactagta aattctacgt cgactttgtg 180
aagggccgat tcaccatttc ccaagacaac gccagaata cggatatatc gcaaatgagc 240
ttcctgaaac ctgaggacac ggccatctat tactgtgctg cagcggaccc aagtatatat 300
tatagtatcc tccattgagt ataagtactg gggccagggg acccaggtca ccgtctctc 360
a 361
```

<210> 107

<211> 354

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

<400> 107

```
ctcgagtcag ggggaggctc ggtggaggct ggagggctc tgagactctc ctgtacagcc 60
tctggatacg tatcctctat ggcctgggtc cgccagggtc cagggcagga gcgcgagggg 120
gtcgcggttg ttcaaaccgc tgacaatagt gcattatatg gcgactccgt gaagggccga 180
ttcaccatct cccacgacaa cgccaagaac acgctgtatc tgcaaatgcg caacctgcaa 240
cctgacgaca ctggcgtgta ctactgtgct gcccacaaaga aggatcgtac tagatgggcc 300
gagcctcgag aatggaacaa ctggggccag gggacccagg tcaccgtctc ctca 354
```

<210> 108

<211> 381

<212> ADN

<213> *Camelus dromaderius*

<400> 108

```
ctcgagtcag gtgtccggtc tgatgtgcag ctggtggcgt ctgggggagg ctgggtgcag 60
gctggaggct ctctgagact ctctgtaca gcctctggag acagtttcag tagatttgcc 120
atgtcttggc tccgccaggc tccaggggag gaggcgcaat tggctcgaag cattcaaagt 180
aatggaagga caactgaggc cgattccgtg caaggccgat tcaccatctc ccgagacaat 240
tccaggaaca cagtgtatct gcaaatgaac agcctgaaac ccgaggacac ggccgtgtat 300
tactgtgggg cagtctccct aatggaccga atttcccaac atgggtgccg gggccagggg 360
accaggtca ccgtctcctt a 381
```

<210> 109

<211> 18

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

<400> 109

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15
Glu Leu
```

<210> 110

<211> 18

<212> PRT

<213> *Camelus dromedarius*

<400> 110

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15
Glu Met
```

<210> 111

<211> 18

ES 2 338 791 T3

<212> PRT
 <213> *Camelus dromedarius*
 5 <400> 111
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Met
 10 <210> 112
 <211> 24
 <212> PRT
 15 <213> *Camelus dromedarius*
 <400> 112
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 1 5 10 15
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20
 <210> 113
 25 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Humano
 30 <400> 113
 Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 1 5 10 15
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20
 35 <210> 114
 <211> 24
 <212> PRT
 40 <213> Humano
 <400> 114
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 1 5 10 15
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20
 50 <210> 115
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Humano
 55 <400> 115
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Asp Glu Leu
 60 <210> 116
 <211> 19
 <212> PRT
 65 <213> Humano

ES 2 338 791 T3

<400> 116

5 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Glu Glu Met

<210> 117

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Humano

<400> 117

15 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Glu Glu Met

<210> 118

20 <211> 30

<212> PRT

<213> múrido

25 <400> 118

 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
 1 5 10 15
30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 119

<211> 29

35 <212> PRT

<213> Humano

<400> 119

40 Glu Val Gln Leu Leu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25

45 <210> 120

<211> 11

<212> PRT

50 <213> Humano

<400> 120

55 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 121

<211> 11

60 <212> PRT

<213> Humano

<400> 121

65 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

ES 2 338 791 T3

<210> 122
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> m rido

 <400> 122

 10 **Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser**
 1 5 10

 <210> 123
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> m rido

 <400> 123

 20 **Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala**
 1 5 10

 <210> 124
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> m rido

 <400> 124

 30 **Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser**
 1 5 10

 35 <210> 125
 <211> 21
 <212> PRT
 40 <213> m rido

 <400> 125

 45 **Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr**
 1 5 10 15
 Val Thr Val Ser Ser
 20

 <210> 126
 50 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Humano

 55 <400> 126

 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr
 1 5 10 15
 His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Cys Ser Asp Thr Pro Pro
 20 25 30
 Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro
 35 40 45
 Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 50 55 60
 Leu Phe Pro
 65

ES 2 338 791 T3

<210> 127

<211> 35

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 127

10 Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 1 5 10 15
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

15 20 25 30
 Leu Phe Pro
 35

<210> 128

20 <211> 31

<212> PRT

<213> Humano

25 <400> 128

 Lys Val Lys Val Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 1 5 10 15
30 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 20 25 30

<210> 129

35 <211> 32

<212> PRT

<213> Humano

40 <400> 129

 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 1 5 10 15
45 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 20 25 30

<210> 130

50 <211> 11

<212> PRT

<213> Humano

55 <400> 130

 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

60 <210> 131

<211> 98

<212> PRT

65 <213> Humano

ES 2 338 791 T3

<400> 131

	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Gly	Lys	Pro	Gly	Ala
5	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp
			20					25						30		
	Met	His	Trp	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Arg	Gly	Arg	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg
			35					40					45			
10	Ile	Asp	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Lys	Asn	Glu	Phe	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr
		50					55					60				
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Pro	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Ser	Ser	Leu
	65					70					75					80
	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg				
15					85					90						

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65