



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 863**

51 Int. Cl.:

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02726398 .7**

86 Fecha de presentación : **24.04.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1414858**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54

Título: **Anticuerpos VHH camélidos de cadena sencilla, método para su producción en un mamífero y sus usos.**

30

Prioridad: **24.04.2001 GB 0110029**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73

Titular/es:
**Erasmus University Medical Center Rotterdam
Dr. Molewaterplein 50
3015 GE Rotterdam, NL**

72

Inventor/es: **Grosveld, Frank**

74

Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 284 863 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos VHH camélidos de cadena sencilla, método para su producción en un mamífero y sus usos.

5 La presente invención se refiere a un método para la generación de inmunoglobulinas de una cadena sencilla en un mamífero. En particular, la presente invención se refiere a un método para la generación de anticuerpos VHH para camélidos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla generados usando el método de la presente invención y los usos del mismo también se describen.

10 **Contexto de la invención**

El dominio de enlace de antígeno de un anticuerpo comprende dos regiones separadas: un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (V_L : que puede ser bien V_{κ} o N_{λ}). El propio punto de enlace de antígeno se forma por seis ciclos de polipéptidos: tres del dominio VH (H1, H2 y H3) y tres del dominio V_L (L1, L2 y L3). Un diverso repertorio primario de genes V que codifican los dominios VH y V_L se produce por la redistribución combinatoria de los segmentos de genes. El gen VH se produce por la recombinación de tres segmentos de gen, VH, D y J_H . En los humanos, existen aproximadamente 51 segmentos VH (Cook y Tomlinson (1995) *Immunol Today*, 16: 237), 25 segmentos funcionales D (Corbett *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.*, 268: 69) y 6 segmentos funcionales J_H (Ravetch *et al.* (1981) *Cell*, 27: 583), dependiendo del haplotipo. El segmento VH codifica la región de la cadena de polipéptido que forma los primeros y segundos ciclos de enlace de antígeno del dominio VH (H1 y H2), mientras que los segmentos VH, D, y J_H se combinan para formar el tercer ciclo de enlace de antígeno del dominio VH (H3). El gen V_L se produce por la recombinación de sólo dos segmentos de gen, V_L y J_L . En humanos, existen aproximadamente 40 segmentos funcionales V_{κ} (Schäble y Zachau (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374: 1001), 31 segmentos funcionales V_{λ} (Williams *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220; Kawasaki *et al.* (1997) *Genome Res.*, 7: 250), 5 segmentos funcionales J_{κ} (Hieter *et al.*, (1982) *J. Biol. Chem.*, 257: 1516) y 4 segmentos funcionales J_{λ} (Vasicek y Leder (1990) *J. Exp. Med.*, 172: 609), dependiendo del haplotipo. El segmento V_L codifica la región de la cadena de polipéptido que forma los primeros y segundos ciclos de enlace de antígeno del dominio V_L (L1 y L2), mientras que los segmentos V_L y J_L se combinan para formar el tercer ciclo de enlace de antígeno del dominio V_L (L3). Se cree que los anticuerpos seleccionados de este primer repertorio son lo suficientemente diversos como para enlazar al menos todos los antígenos con al menos moderada afinidad. Los anticuerpos de elevada afinidad se producen mediante “maduración de afinidad” de los genes redistribuidos, en los cuales las mutaciones de punto se generan y seleccionan por el sistema inmune en la base del enlace mejorado.

El locus de cadena pesada contiene un elevado número de genes de cadena variables (VH, de hecho no son genes completos pero consta de un primer exón codificador más un punto de inicio transcripcional) que se recombinan en dos regiones cortas codificadoras D y J (conocida como recombinación VDJ), que precede a los exones que codifican la región constante de la cadena pesada C_p para dar un gen de cadena pesada de anticuerpo completo conocido como IgM. A continuación, un cambio de clase tiene lugar donde la parte variable se recombina con otra región constante que está localizada en dirección descendente de la región constante para dar IgD, IgG, IgA e IgE (codificados por los exones de los varios C_{δ} , C_{γ} , C_{α} , C_{ϵ} , localizados en dirección descendente del gen para C_{μ} . Las regiones constantes que intervienen se eliminan en este proceso. Un proceso similar tiene lugar en los locus de gen ligero, primero el locus k, y cuando éste no lleva a un anticuerpo productivo en el locus λ (para más información ver Rajewski, K., *Nature* 381, p751-758, 1996; para una revisión más extensa, ver el libro de texto de Immunobiología, Janeway, C., Travers, P., Walport, M. Capra, J., *Current Biology Publications/Churchill Livingstone/Garland Publishing*, cuarta edición, 1999, ISBN 0-8153-3217-3).

Los camélidos (camellos, dromedarios y llamas) contienen, además de los anticuerpos de cadenas normales pesada y ligera (2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas en un anticuerpo), anticuerpos de cadena sencilla (conteniendo sólo cadenas pesadas). Estos se codifican por un conjunto distinto de segmentos VH referidos como genes VHH. El enlace de antígeno para anticuerpos de cadena sencilla es diferente del visto con anticuerpos convencionales, pero la elevada afinidad se logra del mismo modo, es decir, mediante hipermutación de la región variable y selección de células que expresan tales anticuerpos de elevada afinidad (saturación de afinidad). El VH y VHH se dispersan en el genoma (es decir, aparecen mezclados entre sí). La identificación de un segmento D idéntico en un VH y VHH cADN sugiere el uso común del segmento D para VH y VHH. El VHH natural que contiene anticuerpos no tienen el dominio entero C_{H1} de la región constante de la cadena pesada. El exón que codifica el dominio C_{H1} está presente en el genoma pero se separan debido a la pérdida de una secuencia receptora de empalme funcional en el lado 5' del exón C_{H1} . Como resultado la región VDJ se empalma en el exón $CH2$. Cuando un VHH se recombina en tales regiones constantes (C_{H2} , C_{H3}) se produce un anticuerpo que actúa como un anticuerpo de cadena sencilla (es decir, un anticuerpo de dos cadenas pesadas sin una interacción de cadena ligera). El enlace de un antígeno es diferente del visto con un anticuerpo convencional, pero la elevada afinidad se consigue del mismo modo, es decir, mediante hipermutación de la región variable y selección de células que expresan tales anticuerpos de elevada afinidad.

La estructura de los dominios aislados VH se ha determinado empleando técnicas NMR y cristalografía de rayos X (Spinell *et al.* (1996), *Nat Structural Biol.* 3, 752). Los datos demuestran que el pliegue de inmunoglobulina está bien conservado en los dominios de camélidos VHH. Dos capas beta (una con cuatro y otra con cinco cadenas beta) se empaquetan contra cada una de ellas y se estabilizan mediante un enlace disulfido intradominio conservado entre C22 y C92. El lado del dominio VHH del camello correspondiente a la interfaz V_L del VH normal en un Fv tiene una

arquitectura un poco diferente. En comparación con el VH humano, cuatro sustituciones de aminoácido se localizan en esta región.

A partir de un estudio sobre todos los ciclos de enlace de antígeno VH en ratones y humanos, resulta aparente que existen sólo un número restringido de posibles conformaciones. Se describen tres y cuatro conformaciones diferentes para el primer y segundo ciclo de enlace de antígeno respectivamente. Estas estructuras canónicas se determinan por la longitud del ciclo en la presencia de residuos particulares en posiciones clave. El ciclo o curva H3 es extremadamente variable en longitud y secuencia (Wu *et al* 1993) *Proteins: structure, funct and genet.*, 16, 1). Sorprendentemente, la curva de enlace de antígeno de los dominios VH del camello se desvían de las definiciones de curva canónica de dominios VHH de ratones y humanos. Esta desviación no podía pronosticarse cuando la longitud de curva y los residuos en las posiciones clave son muy similares entre el VH del camello y el VH del humano. Las estructuras adicionales de curvas canónicas en los dominios VH hace que el repertorio estructural de su paratope sea más grande que el de los dominios VH en fragmentos Fv de anticuerpos convencionales. Además, la región hipervariable alrededor de la primera curva de enlace de antígeno se agrande en comparación con los anticuerpos de ratones y humanos. Se cree que la extensión de esta primera región hipervariable y superficie de enlace de antígeno aumentado concomitante en comparación con el de un VH en un anticuerpo convencional compensa en parte la ausencia de un dominio V_L (Riechmann, L. & Muyldermans, S (199), 231 25-38).

Un anticuerpo camélido VHH de dominio sencillo además de ser más adecuado para el análisis estructural que las moléculas de cadena pesada y de cadena ligera más grandes, también proporciona una unidad de antígeno más pequeña y eficiente. Tal anticuerpo tiene muchos y variados potenciales terapéuticos. Además, se ha descubierto que los anticuerpos camélidos de cadena sencilla pueden enlazarse con antígenos que son inaccesibles a anticuerpos que procesan cadenas ligeras y pesadas. Se cree que esta habilidad se debe a la presencia de una gran tercera curva hipervariable protuberante de 10 aminoácidos o más que pueden insertarse en las cavidades de las superficies del antígeno. Esto es especialmente significativo cuando el punto catalítico de una enzima está localizada en la cavidad más grande en su superficie de proteína. (Ladowski, R.A (1996). *Protein Science* 5, 2438). Tales puntos no son normalmente inmunogénicos para anticuerpos convencionales (Novotny, J *et al.* (1986) *Proc nat Acad Sci USA*, 83, 226). En la estructura del VHH del camello cAb-Lys3, la curva de los 24 residuos H3 penetra profundamente en la zona activa de lisozima (Transue, T.R *et al* (1998) *Pro: Structure, Funt and Genet*, 32, 515), mostrando que los anticuerpos de cadena pesada de los camellos tienen el potencial para formar inhibidores específicos de enzima.

Recientemente, los dominios aislados camélidos VHH han sido generados en bacterias (Riechmann, L *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 231 (1999), 25-38). Sin embargo, los sistemas de expresión bacteriana tienen la desventaja de que no realizan modificaciones post-translacionales. Tales modificaciones, en particular hechos de glicosilación, son cruciales para el funcionamiento efectivo de los anticuerpos, particularmente en un ambiente *in vivo*.

En el mismo estudio, los genes para los dominios VHH del camello se insertaron en los vectores de expresión y se expresaron en células Cos para generar proteínas multidominio. En un ejemplo, un solo anticuerpo intacto de cadena sencilla pesada se generó clonando un VHH de camello particular enfrente de los dominios de la función eje y efectora del IgG1 humano. La expresión en células tiene la ventaja sobre los sistemas de expresión bacteriana de que los hechos de modificación post-translacional se dan en estas células. Consistente con esto fue el descubrimiento de que estos anticuerpos eran completamente activos en un enlace antígeno. El ADN para la generación de estos constructores generalmente se aísla de anticuerpos maduros (es decir, aquellos que han experimentado la maduración por afinidad) generados a partir de células B. A pesar de que estos anticuerpos de cadena ligera expresado en células de mamíferos en un ambiente *in Vitro* pueden enlazarse con uno o más antígenos, no pueden experimentar los procesos de cambio de clase (isotipo) y maduración por afinidad (hipermutación). Por lo tanto, los anticuerpos de cadena sencilla expresados en células Cos no experimentan el proceso de evolución de anticuerpo como aquellos que se dan naturalmente generados de manera natural en un mamífero. Es este proceso de evolución de anticuerpo el que da como resultado la producción de anticuerpos específicos que se enlazan con elevada afinidad. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un método que permita la generación de anticuerpos VHH de cadena sencilla en un mamífero de tal modo que los procesos normales de evolución de anticuerpo puedan tener lugar.

Además, los anticuerpos camélidos de cadena sencilla también se han seleccionado y expresado empleando una tecnología de manifestación fágica. (Riechmann, L. & Davies, S.J. *Biomol. NMR*, 6, 141). Sin embargo y de nuevo los constructores del anticuerpo se generan a partir de ácido nucleico aislado de células B maduras o bazo, y por lo tanto como con el caso anterior, los anticuerpos expresados no experimentan cambio de clase e hipermutación somática (maduración por afinidad) que es necesaria para la producción de anticuerpos específicos que se enlazan con su antígeno con selectividad y elevada afinidad.

La presente invención se dio cuenta de que si podían entender el mecanismo por el cual las moléculas de anticuerpo camélido de cadena sencilla desarrollan (por cambio de clase y maduración por afinidad) durante el primer desarrollo de anticuerpo en células B, entonces este sistema puede recrearse *in vivo*. Esto permitiría la generación de vastas generaciones de un anticuerpo desarrollado de cadena sencilla para aplicaciones estructurales, terapéuticas y de diagnóstico.

Resumen de la invención

Las moléculas de anticuerpo que comprenden tanto cadenas pesadas como cadenas ligeras cambian las clases durante el desarrollo de célula B. Las células B en desarrollo en la médula espinal expresan primero IgM unido a la membrana. Durante el desarrollo se expresa IgG secretorio. En el caso de anticuerpos que poseen tanto cadenas ligeras como pesadas, una región J se recombina con una región C μ para producir un IgM que comprende regiones VH, D y J. El IgM que produce células además madura por cambio a un región constante diferente de cadena pesada para producir IgA por ejemplo. El mecanismo de recombinación implica una cadena pseudo-ligera que recombina con el VH parte de IgM, la cadena pseudo-ligera estando presente durante el primer linaje de célula B.

La presente invención se percató de que la compresión del mecanismo por medio del cual los anticuerpos de cadena sencilla cambian clases y/o experimentan maduración por afinidad (evolución de anticuerpo) durante el desarrollo de células pre-B permitiría generarse un locus VHH como aquí se define que dio como resultado la producción de un anticuerpo VHH específico de cadena sencilla que experimenta un proceso de evolución similar o el mismo que el de los anticuerpos camélidos producidos en su ambiente nativo.

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo de cadena sencilla pesada VHH en un mamífero transgénico no humano que comprenda los pasos de expresión de un locus de cadena pesada VHH heterólogo en dicho mamífero, tal y como se define en la reivindicación 1.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo de cadena pesada sencilla VH camélido en un mamífero transgénico no humano que comprenda el paso de expresan un locus de cadena pesada VHH de camello en dicho mamífero, tal y como se define en la reivindicación 1. Las características preferentes de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

Preferentemente, el locus de cadena pesada VHH o el locus de cadena pesada VH de camello comprende al menos una secuencia de combinación (rss) capaz de recombinar una región J directamente con un gen de cadena pesada constante C γ .

Preferentemente, el locus de cadena pesada VH de camello comprende al menos una región D de origen humano y al menos una región J de origen humano.

Los presentes inventores han demostrado que en el caso de anticuerpos de cadena pesada sencilla, el cambio de clase se da para formar scAb (una completa cadena polipéptido de anticuerpo de cadena pesada sencilla). Este mecanismo incluye la recombinación de la región J directamente con un gen de región de cadena pesada C γ de la región de cadena pesada constante, preferentemente en la médula espinal resultante en la generación de un scIgG (molécula IgG de cadena sencilla). La presencia de una secuencia de señal de recombinación (rss) en el constructo permite la conexión de la región J directamente con un gen C γ .

En el contexto de la presente invención, el mamífero no es un humano. El mamífero transgénico es de manera ventajosa más pequeño que un camélido y más fácil de mantener e inmunizar con los antígenos deseados. Los ratones son especialmente preferentes. Mamíferos alternativos incluyen cabras, ovejas, gatos perros y otros mamíferos domésticos y salvajes también pueden emplearse.

De modo ventajoso, los locus de cadena pesada endógenos al mamífero se eliminan o silencian cuando un anticuerpo de cadena sencilla se expresa de acuerdo con el método de la presente invención. Técnicas adecuadas para esto se describen en WO00/26373 o WO96/33266 y (Li y Baker (2000) Genetics 156(2):809-821; Kitamura y Rajewsky (1992); Nature 356, 154-156).

El término “un anticuerpo de cadena pesada sencilla VHH” significa una molécula de anticuerpo que se compone sólo de cadenas pesadas (generalmente dos) y no se compone de ninguna cadena ligera. Cada cadena pesada comprende una región variable (codificada por exones VHH, D y J) y una región constante. La región constante además comprende un número de CH (dominios de cadena pesada constantes), ventajosamente consta de dos: un dominio CH2 y un dominio CH3 codificados por un gen de región constante. Un anticuerpo de cadena sencilla VHH como aquí se define no posee un dominio funcional CH1 y también carece de un dominio funcional CH4. Es la falta de un dominio funcional CH1 (que en los anticuerpos convencionales posee el lugar de anclaje para el dominio constante de la cadena ligera) lo que cuenta para la inhabilidad de los anticuerpos de cadena pesada para asociarse con cadenas ligeras para formar anticuerpos convencionales.

El término “un anticuerpo de cadena pesada sencilla VH de camello” significa una molécula de anticuerpo que se compone sólo de cadenas pesadas (generalmente dos) y no se compone de ninguna cadena ligera. Cada cadena pesada comprende una región variable (codificada por “un exón VH de camello”, exones D y J) y una región constante. La región constante consta al menos de un gen de región constante. Cada gen de región constante comprende un número de exones de región constantes, cada exón codificando un dominio CH de región constante. Generalmente, la región constante comprende dos dominios CH: un dominio CH2 y un dominio CH3. Un anticuerpo de cadena sencilla VH de camello como aquí se define no posee un dominio funcional CH1 (que en los anticuerpos convencionales posee el lugar de anclaje para el dominio constante de la cadena ligera) lo que cuenta para la inhabilidad de los anticuerpos de cadena pesada para asociarse con cadenas ligeras para formar anticuerpos convencionales.

ES 2 284 863 T3

En el contexto de la presente invención, el término “heterólogo” significa un locus de cadena pesada VHH como aquí se describe que no es endógeno para el mamífero. Eso es en el caso de que el mamífero sea un camélido, es decir, un camello o una llama, entonces la expresión es de un locus VHH que no se encuentra normalmente dentro de un camello o llama respectivamente.

5 “Un locus de cadena pesada VHH” en el contexto de la presente invención está formado por una “región VHH”, una “región J”, una “región D” y una “región constante de cadena pesada”. Cada región VHH comprende un exón VHH, cada región J un exón J, y cada región D un exón D, y cada región constante de cadena pesada comprende uno o más genes de región constante de cadena pesada. Además, cada región VHH básicamente no comprende uno o más exones VH funcionales.

10 Un “exón/región VHH” en el contexto de la presente invención describe una secuencia codificadora VHH que se da naturalmente como aquellas encontradas en camélidos y cualquier homólogo, derivados o fragmentos del mismo siempre y cuando el exón/región resultante recombine con un exón/región D, un exón/región J y una región de cadena pesada constante (que está formada por varios exones) de acuerdo con la presente invención para generar un anticuerpo de cadena sencilla VHH como aquí se define, cuando se expresa el ácido nucleico.

20 Un “locus de cadena pesada VH de camello” está formado por una “región VH de camello” como aquí se define, una “región J”, y una “región K” y una “región de cadena pesada constante”. Cada región VH de camello está formada por un exón VH de camello, cada región J un exón J, y cada región D un exón D, y cada región constante de cadena pesada comprende uno o más genes de región constante de cadena pesada.

25 Un “exón/región VH de camello” en el contexto de la presente invención describe una secuencia codificadora VH que se da naturalmente derivada de los mamíferos diferentes a los camélidos, por ejemplo un humano que ha sido mutado de tal modo que la secuencia sea la misma que la de un exón camélido. Un exón VH de camello también incluye en su alcance cualquier homólogo, derivado o fragmento del exón siempre y cuando el exón/región pueda recombinarse con un exón/región D, un exón/región J y una región de cadena pesada constante que está formada por uno o más exones para generar un anticuerpo de cadena sencilla VH de camello como aquí se define.

30 Los exones VH y VHH pueden derivarse de fuentes que ocurren naturalmente o pueden sintetizarse usando métodos familiares para aquellos familiarizados con la técnica y aquí descritos.

35 Así mismo, en el contexto de la presente invención los términos “un exón D” y “un exón J” incluyen secuencias que ocurren de manera natural de exones D y J que se encuentran en camélidos u otras especies de mamíferos. Los términos exones D y J también incluyen sus derivados, homólogos y fragmentos de los mismos y como resultado el exón puede recombinarse con los componentes restantes de un locus de anticuerpo de cadena pesada como aquí se describe (bien VH de camello o VHH) para generar un anticuerpo de cadena sencilla como aquí se describe. Los exones/regiones D y J pueden derivarse de fuentes que ocurren naturalmente o pueden sintetizarse usando métodos familiares para aquellos familiarizados con la técnica y aquí descritos.

40 Además, un locus de anticuerpo de cadena pesada como aquí se describe (bien VH de camello o VHH) comprende una región de ADN que codifica un polipéptido de cadena pesada constante (una región de cadena pesada constante).

45 Cada región de cadena pesada constante comprende al menos un gen de cadena pesada constante que es $C\gamma$, para que la generación de una cadena sencilla IgG pueda dar lugar. Cada gen de cadena pesada constante comprende uno o más exones de cadena pesada constante que puede ser de origen camélido o no camélido y se seleccionan de un grupo consistente en $C\delta$, $C\gamma_{1-4}$ y $C\alpha_{1-2}$. Preferentemente, al menos un exón de cadena pesada constante en un locus de anticuerpo de cadena pesada es de origen humano, de ratón o conejo. De manera ventajosa, al menos un exón de cadena pesada $C\gamma$ es de origen humano. Cuando se expresa la región de cadena pesada constante falta un dominio funcional CH1 y CH4 que están presentes en anticuerpos de cadenas duales. De manera ventajosa, sólo uno o más genes $C\gamma 2$ y/o $C\gamma 3$ con dominios CH1 modificados (no funcionales) están presentes en la región de cadena pesada constante.

55 Un “exón de región de cadena pesada constante” (“exón C_H ”) como aquí se define incluye las secuencias de exones C_H que ocurren de manera natural como aquellos que se encuentran en los camélidos o humanos u otros mamíferos incluyendo conejos y ratones. El término “exón C_H ” también incluye dentro de su alcance derivados, homólogos y fragmentos de los mismos siempre y cuando el exón C_H sea capaz de formar un anticuerpo de cadena pesada sencilla funcional (que conste de regiones codificadas por exones VHH o exones VH de camello) como aquí se definen cuando es un componente de una región de cadena pesada constante.

60 Generalmente, los genes C_H comprenden tres o cuatro exones (C_{H1} - C_{H4}) que codifican diferentes dominios de cada polipéptido de cadena pesada constante, con generalmente dos polipéptidos que constituyen un anticuerpo de cadena pesada sencilla como aquí se describe. Sin embargo, como se ha debatido previamente, los anticuerpos de cadena sencilla de VHH y VH de camello no poseen un CH1 funcional (conteniendo la región de anclaje del dominio de cadena ligera) o CH4. Por lo tanto, los locus de anticuerpo de cadena pesada sencilla poseen uno o más genes que no expresan dominios funcionales CH1 o CH4. Esto puede ocurrir por mutación, eliminación, sustitución u otro tratamiento de los exones CH1 y CH4 del gen de región constante de cadena pesada.

ES 2 284 863 T3

Preferentemente, el locus VHH de cadena sencilla comprende al menos un gen de cadena pesada constante donde el ácido nucleico que codifica el dominio CH1 y CH4 es mutado eliminado o sustituido o sino tratado para que la cadena pesada constante de anticuerpos de cadena sencilla VHH expresada como aquí se definen no contenga un dominio CH1 y un dominio CH4 funcional.

5 Para evitar cualquier duda, el término “origen conejo” u “origen humano” como aquí se refiere, significa que la secuencia de ácido nucleico de uno o más exones que comprenden un locus de anticuerpo de cadena pesada (bien VH de camello o VHH) es igual que los exones de locus humanos o de conejo que ocurren de manera natural. Un experto en la técnica apreciará que estos exones pueden derivarse de fuentes naturales o pueden sintetizarse usando métodos familiares para aquellos expertos en la técnica y aquí descritos.

10 Cada “región VHH o VH de camello” comprende un exón VH o exón VH de camello. Cada región J y cada región D comprenden un exón J y un exón D respectivamente. Preferentemente, cada locus de cadena pesada comprende más de uno, más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6 exones/regiones J y/o D. Más preferentemente, un locus VH o locus VH de camello comprende el mismo número exones/regiones VHH y/o exones/regiones D y/o exones/regiones J que aquellos encontrados en un camélido.

20 De manera ventajosa, el método de la presente invención es para la producción de un anticuerpo de cadena sencilla por la expresión de un locus de cadena pesada VHH o locus de cadena pesada VH de camello que comprende uno o más exones de cadena pesada constante de humano, conejo o ratón como aquí se define. Esto es, preferentemente un anticuerpo de cadena pesada sencilla se genera por la expresión de un locus híbrido camélido/humano o un locus híbrido camélido/conejo o un locus híbrido camélido/ratón. En una realización especialmente preferente de este aspecto de la invención, el locus de cadena pesada sencilla expresado de acuerdo con el método de la presente invención comprende todos los exones VHH de origen camélido y todos los exones de región de cadena pesada constante D, J de origen humano, origen de conejo o ratón. En una realización adicional preferente, el locus de cadena pesada sencilla expresado de acuerdo con el método de la presente invención comprende todos los exones VH de camello y todos los exones D, J y de región de cadena pesada constante de origen humano, origen de conejo o ratón.

30 Preferentemente, el locus de cadena pesada comprende uno o más puntos de cinta que permite el directo paso a la cinta del locus desde un vector a otro. De manera ventajosa, una o más cintas se sitúan en la secuencia principal 5' del locus y/o región no traducida 3' del locus. Preferentemente, uno o más puntos de cinta están situados tanto en la secuencia principal 5' del locus como en la región no traducida 3' del locus. El paso directo a la cinta permite, por ejemplo, el movimiento del ácido nucleico a un vector de expresión bacteriana para la adición de etiquetas y señales.

35 Este enfoque de generación de anticuerpos híbridos de cadena pesada sencilla tal y como se ha descrito anteriormente es de particular uso en la generación de anticuerpos para uso terapéutico humano cuando a menudo la administración de anticuerpos a una especie de vertebrados que es de origen diferente a la fuente de los anticuerpos da como resultado el comienzo de una respuesta inmune en contra de aquellos anticuerpos administrados. Los anticuerpos híbridos de cadena sencilla camélidos/humanos son por lo tanto potencialmente menos inmunogénicos que los anticuerpos camélidos de cadena sencilla cuando se administran a humanos.

40 En el contexto de la presente invención, lo mismo incluye sustancialmente lo mismo. Sustancialmente lo mismo significa más del 80% homólogo, preferentemente más de 85%, 90%, 95% homólogo. Más preferentemente, más del 96, 97, 98% homólogo. Más preferentemente, sustancialmente lo mismo significa que la región humana mutada VH es más del 99% homóloga con una región VHH camélida.

50 Los anticuerpos producidos de acuerdo con la presente invención tienen una ventaja sobre otros de la técnica anterior en el sentido de que experimentan un proceso de cambio de clase que es similar a o el mismo que el del anticuerpo camélido de cadena sencilla generado en su ambiente normal. Los anticuerpos que se obtienen de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. De manera ventajosa, son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden generarse utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. De manera ventajosa, los hibridomas pueden emplearse para generar anticuerpos monoclonales. Las técnicas resultarán familiares para aquellos expertos en la técnica y aquí se describen.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende un locus de cadena pesada VHH de acuerdo con la presente invención.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende un locus de cadena pesada VH de camello de acuerdo con la presente invención.

Los vectores adecuados resultarán familiares para aquellos expertos en la técnica. De manera ventajosa, un vector adecuado para la inserción de grandes cantidades de ácido nucleico, suficientes como para codificar un locus completo de cadena pesada de inmunoglobulina son preferentes. Vectores adecuados incluyen levadura y cromosomas artificiales bacteriales como YACs y BACs. De manera ventajosa, los vectores se construyen para que se pueda llevar a cabo un paso a la cinta directo de ácido nucleico que codifica un locus de anticuerpo de cadena pesada sencilla como aquí se define en un vector diferente. Por ejemplo, la codificación de cADN transcrita inversa para un anticuerpo de cadena pesada puede “grabarse” en un vector de expresión bacteriana permitiendo la adición de etiquetas, señales y epítopes.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped transformada con un locus VHH de acuerdo con la presente invención.

En el contexto de la presente invención, el término “un mamífero transgénico” no incluye en su alcance un humano transgénico. Preferentemente, un mamífero transgénico se selecciona del grupo consistente en: un ratón, rata, cerdo de guinea, hámster, mono o conejo. De manera ventajosa, es un ratón.

De manera ventajosa, los locus de cadena pesada endógenos al animal transgénico se eliminan o silencian en un mamífero transgénico usado en el método de acuerdo con la presente invención. Técnicas adecuadas para esto se describen en WO00/26373 o WO9633266 y (Li y Baker (2000) Genetics 156(2): 809-821; Kitamura y Rajewsky (1992) Nature 356, 154-156).

El anticuerpo que produce células puede derivarse de animales transgénicos y utilizarse por ejemplo para la preparación de hibridomas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla VHH como aquí se define. Además o de manera alternativa, las secuencias de ácido nucleico pueden aislarse de los mamíferos transgénicos y utilizarse para producir anticuerpos de cadena sencilla, usando técnicas de ADN recombinante que resultan familiares para aquellos especializados en la materia. De manera alternativa o por añadidura, los anticuerpos específicos de cadena sencilla pueden generarse inmunizando un animal transgénico como aquí se describe.

Por lo tanto, aquí se describe un método para la producción de anticuerpos de cadena sencilla inmunizando un mamífero transgénico como aquí se describe con un antígeno.

Preferentemente, el mamífero es un ratón.

El término “inmunizar” un mamífero significa administrar a un animal mamífero un antígeno de tal modo que surja una respuesta inmune contra ese antígeno. Métodos adecuados para la inmunización de mamíferos resultarán familiares para aquellos expertos en la materia y se describen aquí. Antígenos adecuados pueden ser los que se dan de manera natural o los sintéticos. Los antígenos que se dan de manera natural incluyen proteínas que pueden ser, por ejemplo, enzimas o cofactores, péptidos y moléculas de ácido nucleicos. Una persona especializada en la técnica apreciará que esta lista no pretende ser exhaustiva.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un locus de anticuerpo de cadena sencilla preferente.

Definiciones

“Un gen” comprende uno o más exones que codifican un mRNA completo. Un “gen de anticuerpo” comprende exones V, D, J que se recombinan para formar una región codificadora VDJ y que además se recombina con una región de cadena pesada constante que está formada por uno o más exones de cadena pesada constante. Hay muchos subgrupos de exones V, D, J y C. Una región particular V tiene un exón, una región D tiene un exón, una región J tiene un exón y una región C tiene varios exones. Juntos, forman un gen completo tras la recombinación cuando un exón V, un exón D, un exón J y una región C se han seleccionado.

“Exón” e “Intrón”. Un exón es una secuencia mensajera codificadora de deoxinucleótidos. Esto es, es cualquier secuencia de ADN en eucariotes que en último lugar se expresará en mRNA maduro o moléculas rARN. Los exones comúnmente se dispersan con intrones. Los intrones son secuencias de ADN no codificadoras. Esto es que son secuencias de ADN que finalmente no se expresarán en una molécula madura de ARN.

Los intrones se separan del ARN recién transcrito con el fin de generar mRNA maduro.

Un “locus de cadena pesada VHH” en el contexto de la presente invención comprende una “región VHH”, un “exón/región J”, un “exón/región D” y “una región de cadena pesada constante”. Cada región VHH comprende un exón VHH, cada región J un exón J y cada región D un exón D y cada región constante de cadena pesada comprende uno o más exones de región constante de cadena pesada.

Un “exón VHH” en el contexto de la presente invención describe una secuencia codificadora VHH que se da de manera natural como aquellas que se encuentran en los camélidos y cualquier homólogo, derivado o fragmento del mismo, siempre y cuando el exón resultante pueda, cuando un constituyente de una región VHH como aquí se define se recombine con al menos una región D, al menos una región J y al menos una región constante de cadena pesada para generar un anticuerpo de cadena sencilla VHH como aquí se define, cuando el ácido nucleico se expresa.

Un “locus de cadena pesada VH de camello” en el contexto de la presente invención está comprendido por una o más “regiones VH de camello” como aquí se definen, una o más “regiones J” una o más “regiones D” y una “región constante de cadena pesada”. Cada región VH de camello comprende un exón VH de camello, cada región J un exón J y cada región D un exón D y cada región constante de cadena pesada comprende uno o más genes de región constante de cadena pesada.

Un “exón de VH de camello” en el contexto de la presente invención describe una secuencia codificadora VH que se da de manera natural derivada de mamíferos diferentes a los camélidos, como por ejemplo un humano que haya sido mutado de tal modo que la secuencia es la misma que las del exón camélido. Un exón VH de camello también incluye cualquier homólogo, derivado o fragmento del mismo, siempre y cuando el exón resultante pueda, cuando un constituyente de una región VH de camello como aquí se define se recombine con al menos una región D, una región J y una región constante de cadena pesada para generar un anticuerpo de cadena sencilla VH de camello como aquí se define.

Un “exón de región constante de cadena pesada” (“C_H exón”) como aquí se define incluye las secuencias de los exones C_H que ocurren de manera natural como aquellos que se encuentran en camélidos o humanos u otros mamíferos incluyendo conejos y ratones. El término “C_H exón” también incluye en su alcance los derivados, homólogos y fragmentos del mismo siempre y cuando el exón C_H sea capaz de formar un anticuerpo de cadena sencilla funcional como aquí se define cuando es un componente de una región de cadena pesada constante. Genalmente, los exones C_H son de cuatro tipos diferentes (C_{H1}-C_{H4}) que codifican diferentes porciones (dominios) de cada polipéptido de cadena pesada constante. Sin embargo, los anticuerpos de cadena sencilla de VHH y VH de camello, no poseen un dominio funcional CH1 (que contiene la región de anclaje de dominio de cadena ligera) ni poseen un dominio funcional CH4. Existe un número de subgrupos de exones de región de cadena pesada constante. Las diferentes clases de anticuerpo poseen diferentes exones CH por ejemplo, moléculas IgM poseen uno o más exones de región constante C_μ y moléculas IgM poseen uno o más exones C_γ.

El término “anticuerpo de cadena pesada sencilla VHH” en el contexto de la presente invención significa una molécula de anticuerpo que está formada por sólo cadenas pesadas (generalmente dos) y no está formada por ninguna cadena ligera. Cada cadena pesada comprende una región variable (codificada por exones VHH, D y J) y una región constante. La región constante además comprende un número de dominios CH codificados por exones de región de cadena pesada constante, generalmente comprende dos: un dominio CH2 y un dominio CH3. Un anticuerpo de cadena sencilla VHH como aquí se define no posee un dominio funcional CH1 ni un dominio funcional CH4. Es la falta de un dominio funcional CH1 (que en anticuerpos convencionales posee el lugar de anclaje para el dominio constante de la cadena ligera) lo que cuenta para la inhabilidad de los anticuerpos de cadena pesada para asociarse con cadenas ligeras para formar anticuerpos convencionales. La subclase de anticuerpos conocidos como scIgG2 y/o scIgG3 comprenden sólo genes C_γ2 y/o C_γ3.

El término “un anticuerpo de cadena pesada sencilla VH de camello” en el contexto de la presente invención significa una molécula de anticuerpo que está formada por sólo cadenas pesadas (generalmente dos) y no está formada por ninguna cadena ligera. Cada cadena pesada comprende una región variable (codificada por exón VH de camello, exones D y J) y una región constante. La región constante codificada por exones de región constante además codifica un número de dominios CH, generalmente comprende dos: un dominio CH2 y un dominio CH3. Un anticuerpo de cadena sencilla VH de camello como aquí se define no posee un dominio funcional CH1 ni un dominio funcional CH4. Es la falta de un dominio funcional CH1 (que en anticuerpos convencionales posee el lugar de anclaje para el dominio constante de la cadena ligera) lo que cuenta para la inhabilidad de los anticuerpos de cadena pesada para asociarse con cadenas ligeras para formar anticuerpos convencionales.

“Anticuerpos” como aquí se emplea, se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo capaces de enlazarse con un objetivo seleccionado, e incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos obtenidos por ingeniería incluyendo anticuerpos quiméricos, injertados CDR y humanizados, y anticuerpos seleccionados artificialmente producidos usando la manifestación del fago o técnicas alternativas. Los fragmentos pequeños de anticuerpos poseen propiedades ventajosas para aplicaciones de diagnóstico o terapéutico debido a su pequeño tamaño y la consecuente superior distribución en el tejido.

“Evolución de anticuerpo” describe el proceso de cambio de clase y maduración por afinidad (hipermutación somática) que ocurre durante el desarrollo de anticuerpo y que da como resultado la generación de anticuerpos que se enlazan de manera selectiva y con elevada afinidad.

Descripción detallada de la invención

Técnicas Generales

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí empleados tienen el mismo significado que el comúnmente se entiende por parte del especializado en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácido nucleico, técnicas de hibridización y bioquímica). Técnicas estándar se emplean para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos (ver generalmente, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d, ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed. John Wiley & Sons, Inc. y métodos químicos. Además, Harlow & Lane, *A Laboratory Manual* Spring Harbor, N.Y., es referido para técnicas estándar inmunológicas.

Locus de cadena pesada VH/h de la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo de cadena pesada sencilla VHH en un mamífero que comprende el paso de expresión de un locus de cadena pesada VHH homólogo en ese mamífero.

ES 2 284 863 T3

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo de cadena pesada VH de camello en un mamífero que comprende el paso de expresión de un locus de cadena pesada VH de camello en ese mamífero.

5 La construcción de varios locus de cadena pesada VHH también se describe en el resumen de esta invención.

De manera ventajosa, un locus comprende uno o más puntos FRT (objetivo de recombinación flp), y dos o más puntos LoxP (que consisten en dos repeticiones invertidas trece separadas por una región separadora asimétrica 8bp (Brian saber, *Methods of Enzymology*; 1993, Vol 225, 890-900).

10

Preferentemente, hay al menos dos puntos loxP en un locus. La presencia de los puntos FRT en el locus permite la producción de transgénicos de única copia, mientras que la presencia de locus Lox permite la eliminación de genes de cadena pesada IgM e IgD si es necesario.

15 *Vectores (A)*

La presente invención también proporciona vectores que incluyen un constructo de la presente invención. Esencialmente se proporcionan dos tipos de vectores, vectores de duplicación y vectores de transformación.

20 (I) *Vectores de duplicación*

Los constructos pueden incorporarse en un vector duplicable recombinante como un vector BAC. El vector puede usarse para duplicar el constructo en una célula huésped compatible. Por lo tanto, aquí se describe un método de realizar constructos introduciendo un constructo en el vector duplicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible, y creciendo la célula huésped bajo condiciones que provocan la duplicación del constructo. El constructo puede recuperarse de la célula huésped. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura, líneas celulares de mamíferos, y otras líneas celulares eucarióticas, por ejemplo células de insecto Sf9 (baculovirus).

25

(II) *Vectores de transformación*

30

Los constructos pueden también incorporarse en un vector capaz de insertar el constructo en un genoma recipiente y por lo tanto consiguen la transformación. Además del constructo, tales vectores de transformación pueden incluir uno o más de los siguientes componentes.

35 *Promotores*

El promotor es normalmente seleccionado de promotores que son funcionales en células de mamíferos, a pesar de que los promotores procarióticos y funcionales en otras células eucarióticas pueden usarse. El promotor normalmente se deriva de secuencias promotoras de genes virales o eucarióticos. Por ejemplo, puede ser un promotor derivado del genoma de una célula en la cual va a darse la expresión. Con respecto a los promotores eucarióticos, pueden ser promotores que funcionan de una manera ubicua (como promotores de alfa-actina, beta-actina, tubulina) o, de manera alternativa, una manera específica al tejido (como promotores de genes inmunoglobulina). También pueden ser promotores que responden a estímulos específicos, por ejemplo promotores que se enlazan con receptores de hormona esteroide. Los promotores virales pueden también usarse, por ejemplo el promotor de repetición terminal de virus de leucemia de murina Molones (MMLV LTR), el promotor LTR virus sarcoma Rous (RSV) o el promotor IE citomegalovirus humano (CMV). También puede resultar ventajoso para los promotores que sean provocables para que los niveles de expresión del gen heterólogo puedan regularse durante la vida de la célula. Por provocable se entiende que los niveles de expresión obtenidos usando el promotor puedan regularse.

40

45

Además, cualquiera de estos promotores puede modificarse por la adición de secuencias reguladoras adicionales, por ejemplo secuencias potenciadoras. Los potenciadores específicos del tejido capaces de regular la expresión en células productoras de anticuerpo son preferentes. En particular, el potenciador de cadena pesada necesario para la activación exitosa del locus gen anticuerpo *in vivo* (Serwe, M. y Sablitzky, F. *EMBO J.* 12, p2321-2321, 1993) puede incluirse. Las regiones de control de locus (LCRs), particularmente el LCR de inmunoglobulina, también pueden usarse. Los potenciadores quiméricos también pueden usarse comprendiendo elementos de secuencia a partir de dos o más potenciadores diferentes.

55

Otros Componentes de Vector

Además del potenciador y el constructo, los vectores de la presente invención preferentemente contienen otros elementos útiles para el funcionamiento óptimo del vector en el mamífero en el cual el vector se inserta. Estos elementos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

60

65 *Construcción de Vectores*

Los vectores empleados para transformar embriones mamíferos se construyen usando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación técnicas de digestión edonucleasa por restricción, litigación, piásmido y purificación

ES 2 284 863 T3

de ADN y ARN, secuencias de ADN, como se describe por ejemplo en Sambrook, Fritsch, y Maniatis, eds. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.[1989]. En general, la construcción de vectores incluirá los siguientes pasos:

- 5 a) el locus del ratón endógeno se inactiva, por ejemplo usando uno de los procedimientos publicados de eliminación o knockout (por ejemplo, Kitamura, D y Rajewski K., *Nature* 352, p154-156, 1992).
- 10 b) La región DJ e IgM de una región de cadena pesada adecuada como aquí se describe está localizada como un ADN recombinante de una biblioteca humana PAC, BAC o YAC y se clona como un fragmento de enzima por restricción, por ejemplo un fragmento Sall . Esta región también contiene el potenciador de cadena pesada necesario para la activación exitosa del locus de gen anticuerpo *in vivo* (ver Serwe, M. Sabitzky, *F. EMBO J.* 12, p2321-2321, 1993).
- 15 c) Un número de exones VHH o VH de camello se clonan en primer lugar como cósmidos por medio de la construcción de una biblioteca genómica ADN mediante técnicas convencionales. Debido a que los exones VHH están localizados entre los exones VH como aquí se describe posteriormente se clonan junto con los exones VHH. Por lo tanto, se realiza una selección de exones VH y VHH. Esta selección de genes puede aislarse como un fragmento MluI (u otra enzima de restricción).
- 20 d) El LCR de cadena pesada de inmunoglobulina humana 3', una región reguladora necesaria para la expresión del locus, se clona como un fragmento de restricción ScaI.
- 25 e) Los exones de región pesada constante se clonan como un fragmento de restricción separado. Los dominios CH₁ y/o CH₄ codificados por sus respectivos exones se vuelven no funcionales por recombinación homóloga en bacterias (Imam *et al.*, *Nucleic Acid Research*, 15:E65, 2000) retirando las secuencias que aceptan el empalme del exón CH₁ y/o exón CH₄ (Nguyen *et al.*, *Mol. Immunol.*, 36, 514-534, 1999).

Los pasos b-e proporcionan las piezas para un locus de cadena pesada VHH o locus de cadena pesada VH de camello (Fig. 3) que debería tomar la función del locus del ratón inactivado descrito en a). Estos locus se construyen clonando cada uno de los fragmentos en el orden adecuado en un vector adecuado, por ejemplo, un vector BAC que contiene una región enlazadora con todos los puntos de restricción anteriormente descritos (Fig. 1). Los locus creados de acuerdo con el método generalmente están en el orden de 200-250 kB en tamaño. Pueden aislarse y purificarse desde el vector mediante técnicas estándar de laboratorio que resultarán familiares para aquellos expertos en la técnica. El ácido nucleico purificados que codifica el "locus de cadena pesada VHH" o un "locus de cadena pesada VH de camello" pueden introducirse posteriormente en los huevos de ratón fertilizados derivados de los ratones knock-out descritos en a) mediante técnicas estándar para obtener ratones transgénicos expresando uno o más locus.

Anticuerpos de cadena sencilla de acuerdo con la presente invención

40 Se entenderá que el término "un anticuerpo de cadena pesada sencilla" y "locus de cadena pesada VHH" también incluye polipéptidos homólogos y secuencias de ácido nucleico obtenidos a partir de cualquier fuente, por ejemplo, homólogos celulares relacionados, homólogos de otras especies y variantes o derivados de los mismos.

45 Por lo tanto, también se describen variantes, homólogos o derivados de lo anticuerpos de cadena pesada sencilla y locus de cadena pesada VHH como aquí se describe.

50 En el contexto de la presente invención, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácido que es al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9% idéntica, preferentemente al menos 98 o 99% idéntica al nivel de aminoácido sobre al menos 30, preferentemente 50, 70, 90 o 100 aminoácidos. Aunque la homología también pueden considerarse en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención es preferible expresar la homología en términos de identidad secuencial.

55 Las comparaciones de homología pueden llevarse a cabo visualmente, o más usualmente, con la ayuda de programas de comparación por secuencia fácilmente disponibles. Estos programas de ordenador disponibles en el mercado pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

60 El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea sobre otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia directamente comparada con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo en algún momento. Esto se llama una alineación "sin huecos". Normalmente, estas alineaciones sin huecos se llevan a cabo sólo sobre un número reducido de residuos (por ejemplo, menos de 50 aminoácidos contiguos).

65 A pesar de que este método es muy simple y consistente, falla al no tomar en consideración que, por ejemplo, en un par idéntico contrario de secuencias, una inserción o eliminación causará que los siguientes residuos de aminoácido se salgan de la alineación, por lo tanto resultando potencialmente en una enorme reducción en el % de homología cuando una alineación global se lleva a cabo. Como consecuencia, la mayor parte de los métodos de secuencia se diseñan para producir alineaciones óptimas que tomen en consideración posibles inserciones y eliminaciones sin sancionar

ES 2 284 863 T3

excesivamente la puntuación de homología total. Esto se consigue insertando “huecos” en la alineación secuencial para intentar al máxima homología local.

5 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan “castigos de hueco” a cada hueco que se da en la alineación para que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación secuencial con el mínimo número de huecos como sea posible, reflejando mayor relación entre las dos secuencias comparadas, logrará un mayor resultado que una con muchos huecos. Los “costos de hueco afines” se usan normalmente de modo que carguen un costo relativamente elevado para la existencia de un hueco y un castigo o pena más pequeña para cada residuo siguiente en el hueco. Esto es el sistema de puntuación más comúnmente usado. Las altas penas de hueco producirán alineaciones más
10 óptimas con menor número de huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten que las penas o castigos de hueco se modifiquen. Sin embargo, es preferible usar los valores por defecto cuando se utilizan dichos software para comparaciones secuenciales. Por ejemplo, cuando se emplea el paquete GCG Wisconsin Bestfit (ver a continuación) la pena de hueco por defecto para secuencias de aminoácido es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

15 El cálculo del porcentaje de homología máxima requiere por lo tanto en primer lugar la producción de una alineación óptima, tomando en cuenta las penas o castigos por huecos. Un programa adecuado de ordenador para llevar a cabo tal alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit ((University of Wisconsin, U.S.A; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otro software que puede llevar a cabo comparaciones secuenciales incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (ver Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* - Capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*,
20 1990, J. Mol. Biol. 403-410) y el juego de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsqueda online y offline (ver Ausubel *et al.* 1999 *ibid*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, es preferible usar el programa GCG Bestfit.

A pesar de que el porcentaje de homología final puede medirse en términos de identidad, el mismo proceso de
25 alineación no se basa en comparaciones de par de todo o nada. En su lugar, se emplea generalmente una matriz de puntuación de similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación par en base a la similitud química o a la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz comúnmente usada es la matriz BLOSUM62 - la matriz por defecto para el juego de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente usan bien los valores por defecto públicos o se suministra una tabla a medida de comparación simbólica (ver manual de usuario para más detalles).
30 Es preferible usar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, como BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el porcentaje de homología, preferentemente el porcentaje de identidad secuencial. El software normalmente hace eso como una parte de la comparación
35 secuencial y genera un resultado numérico.

Métodos para la producción de anticuerpos de cadena sencilla de acuerdo con la presente invención

(A) Animales transgénicos

40 Los locus y vectores de la presente invención pueden introducirse en un animal para producir un animal transgénico.

Insertar los locus de en el genoma de un animal recipiente puede lograrse usando cualquier técnica conocida por
45 aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, microinyección. Tras la introducción de ácido nucleico en un huevo fertilizado, la reimplantación se consigue usando métodos estándar que resultarán familiares para aquellos expertos en la técnica. Normalmente, el huésped sucedáneo es anestesiado, y los huevos se insertan en el oviducto. El número de huevos implantados en un huésped particular variará, pero normalmente será comparable con el número de crías que la especie produce de manera natural.

50 Como alternativa, el ADN puede introducirse en células madre embrionarias (ES) que pueden insertarse en un embrión huésped para derivar ratones transgénicos mediante tecnología estándar.

En una realización adicional el ADN puede introducirse en cualquier célula. Los núcleos de estas células se usan
55 para reemplazar el núcleo de un huevo fertilizado que puede ser de cualquier especie para dar lugar a animales transgénicos. Esta técnica de transferencia nuclear resulta familiar para aquellos expertos en la técnica.

Las crías transgénicas del huésped sucedáneo pueden analizarse para la presencia del transgen mediante cualquier
60 método adecuado. El análisis a menudo se lleva a cabo por análisis Southern y Northern, usando una sonda que es complementaria con al menos una parte del transgen. El análisis de Western blot que usa un ligando específico para el anticuerpo codificado por el transgen puede emplearse como alternativa o método adicional para análisis. Normalmente, los tejidos o células que se espera que expresen los transgenes en los niveles más altos son testados, a pesar de que cualquier tejido o célula puede usarse para este análisis.

65 La proge de los mamíferos transgénicos puede obtenerse apareando el mamífero transgénico con una pareja adecuada, o por fertilización *in vitro* de huevos y/o espermatozoides obtenido a partir del mamífero transgénico. Cuando se emplea la fertilización *in vitro*, el embrión fertilizado puede implantarse en un huésped sucedáneo o incubarse *in vitro*, o ambas cosas. Cuando se emplea el apareamiento par producir la proge transgénica, el mamífero transgénico

ES 2 284 863 T3

puede cruzarse hacia atrás con una línea parental. Usando cualquier método, la progenie puede evaluarse para la presencia del transgen usando métodos descritos anteriormente, u otros métodos apropiados.

El animal puede ser variado siempre y cuando sea un mamífero no humano, como un roedor y preferentemente una rata o ratón. En este aspecto, es también preferible que el animal recipiente sea incapaz de producir anticuerpos que incluyan cadenas ligeras o al menos que tenga una reducida capacidad para producir tales anticuerpos. Para lograr este fin el animal recipiente puede ser un animal "knock out" que sea capaz de tener uno o más de los genes requeridos para la producción de anticuerpos con cadenas ligeras cerradas o suprimidas.

Usando animales recipientes incapaces de producir anticuerpos que incluyan cadenas ligeras o al menos con sólo una reducida capacidad para producir tales anticuerpos, el método de la presente invención permite la eficiente producción de grandes cantidades de anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos que producen células de un animal transgénico tras el reto con un antígeno dado

(B) Tecnología de expresión de fago

Los vectores para la expresión fago fusionan el polipéptido codificado, por ejemplo, el gen III proteína (pill) o gen VIII proteína (pVIII) para la expresión sobre la superficie del fago filamentoso, como M13. Ver Barbas *et al.*, *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (ISBN 0-87969-546-3); Kay *et al.* (eds.), *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, San Diego: Academic Press, Inc., 1996; Abelson *et al.* (eds.), *Combinatorial Chemistry*, Methods in Enzymology vo. 267, Academic Press (May 1996).

Los huéspedes procarióticos son particularmente útiles para la producción de anticuerpos que muestran fago. La tecnología de anticuerpos que muestran fago, en los cuales los fragmentos de región variable de anticuerpo se fusionan, por ejemplo, con el gen II proteína (pill) o gen VIII proteína (pVIII) para mostrar sobre la superficie de fago filamentoso, como M13, está por ahora bien establecida, Sidhu, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11(6):610-6(200); Griffiths *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(1):102-8 (1998); Hoogenboom *et al.*, *Immunotechnology*, 4(1):1-20 (1998); Rader *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology* 8:503-508 (1997); Aujame *et al.*, *Human Antibodies* 8:155-168 (1997); Hoogenboom, *Trends in Biotechnology* 15:62-70 (1997); de Kruif *et al.*, 17:453-455 (1996); Barbas *et al.*, *Trends in Biotechnology* 14:230-234 (1996); Winter *et al.* *Ann. Rev. Immunol.* 433-455 (1994), y técnicas y protocolos requeridos para generar, propagar y analizar y usar los fragmentos de anticuerpo de tales bibliotecas se han recopilado recientemente, Barbas *et al.*, *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (ISBN 0-87969-546-3); Kay *et al.* (eds.), *Phage Display Of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, Inc. (1996); Abelson *et al.* (eds.), *Combinatorial Chemistry*, Methods in Enzymology vol. 267, Academic Press (May 1996).

Para la expresión fago de anticuerpos aquí descritos incluyendo fragmentos de los mismos, de manera ventajosa, se fusionan con la proteína fago g3p.

(C) Hibridomas

La tecnología de ADN recombinante puede usarse para producir anticuerpos de cadena sencilla usando un procedimiento establecido, en cultivo celular de bacterias o preferiblemente de mamíferos. El sistema de cultivo celular seleccionado segrega el producto de anticuerpo de cadena sencilla.

La multiplicación de células hibridoma o células huésped de mamífero *in vitro* se lleva a cabo en un medio adecuado de cultivo, que son los medios habituales estándar de cultivo, por ejemplo Medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) o RPMI 1640 medio, opcionalmente vuelto a llenar por suero de mamífero, por ejemplo, suero de cría fetal, o elementos huella y suplementos sustitutivos del crecimiento, por ejemplo, células alimenticias como células exudadas peritoneales de ratón, células del bazo, macrófagos estrechos de hueso, 2-aminoetanol, insulina, transferina, lipoproteína de baja densidad, ácido oleico, o similares. La multiplicación de células huésped que son células bacteriales o células de levadura también se lleva a cabo en medios de cultivo adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo para bacterias en medio LB, NZCYM, NZYM, NZM, Terrific Broth, SOB, SOC, 2 x YT, o Mínimo Medio M9, y para levadura en medio YDP, YEPA, Medio Mínimo, o Medio de Pérdida Mínima Completa.

La producción *in vitro* proporciona preparaciones de inmunoglobulina relativamente pura y permite que la ampliación de escala dé mayores cantidades de las inmunoglobulinas deseadas. Las técnicas para el cultivo de célula bacteriana, célula de levadura o de mamífero son conocidas en la técnica e incluyen cultivo de suspensión homogéneo, por ejemplo, en un reactor de puente aéreo o en un reactor de agitador continuo, o cultivo de célula inmovilizada o atrapada, por ejemplo, fibras huecas, microcápsulas, o microgotas de azarosa o cartuchos de cerámica.

Grandes cantidades de inmunoglobulinas deseadas también se obtienen multiplicando las células de mamíferos *in vivo*. Con este fin, las células de hibridoma que producen las inmunoglobulinas deseadas se inyectan en mamíferos histocompatibles para provocar crecimiento de anticuerpos que producen tumores. Opcionalmente, los animales se ceban con un hidrocarburo, especialmente aceites minerales como pristana (tetrametil-pentadecano), antes de la inyección. Después de una a tres semanas, las inmunoglobulinas de aíslan de los fluidos corporales de esos mamíferos. Por ejemplo, las células hibridoma obtenidas por la fusión de células mieloma adecuadas con células de bazo que producen anticuerpos de ratones Balb/c, o células transfectadas derivadas de línea celular hibridoma Sp2/0 que producen

ES 2 284 863 T3

los anticuerpos deseados se inyectan intraperitonealmente en ratones Balb/c opcionalmente pretratados con pristana, y, después de una o dos semanas, el fluido ascítico se toma de los animales.

Las técnicas mencionadas y otras técnicas se comentan en , por ejemplo, Kohler y Milstein, (1975) Nature 256:495-497; US 4,376,110; Harlow y Lane, Antibodies; a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor. Técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpo recombinantes se describen en las referencias citadas y también en, por ejemplo, EP 0623679; EP 0368684 y EP 0436597.

Los sobrenadantes del cultivo celular se analizan para los anticuerpos deseados, preferentemente por tinción inmunofluorescente de células que expresan el objetivo deseado por inmunoblot, por un inmunoensayo de enzima, por ejemplo, un ensayo sándwich o un ensayo dot, o un radioinmunoensayo.

Para el aislamiento de anticuerpos, los presentes en los sobrenadantes del cultivo o en el fluido ascítico pueden concentrarse, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio, diálisis contra material higroscópico como glicol polietileno, o filtración por medio de membranas selectivas. Si es necesario y/o desea, los anticuerpos se purifican por los métodos habituales de cromatografía, por ejemplo filtración de gel, cromatografía de intercambio de ion, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía por (inmuno)-afinidad, por ejemplo, cromatografía por afinidad con la molécula objetivo o con Proteína-A.

20 (3) *Inmunización de un animal transgénico*

La presente invención también describe un método para la producción de anticuerpos de cadena sencilla que comprende la administración de un antígeno a un animal transgénico.

Los anticuerpos de cadena sencilla producidos a partir de animales transgénicos incluyen anticuerpos de cadena sencilla policlonales y monoclonales y fragmentos de los mismos. Si se desean los anticuerpos policlonales, el animal transgénico (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) puede inmunizarse con un antígeno y suero del animal inmunizado recogido y tratado de acuerdo con procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales contiene anticuerpos para otros antígenos, los anticuerpos policlonales de interés pueden purificarse mediante cromatografía de inmunoafinidad y técnicas similares que resulten familiares para aquellos especializados en la técnica. Técnicas para producir y procesar antisuero policlonal también son conocidas en la técnica.

Usos de anticuerpos de cadena sencilla de acuerdo con la presente invención

Los anticuerpos de cadena sencilla incluyendo fragmentos de los mismos pueden emplearse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, *in vitro* y en aplicaciones de diagnóstico *in vivo*, y en aplicaciones de reagente y ensayo *in vitro*.

Los usos terapéuticos y profilácticos de anticuerpos de cadena sencilla incluyen la administración de lo anterior a un mamífero recipiente, como un humano.

“Anticuerpos de cadena pesada sencilla VH de camello” poseen varias ventajas sobre las moléculas de anticuerpo de cadena sencilla VHH de camello en el tratamiento de humanos. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla VH de camello poseen un punto de enlace de proteína A en el caso de anticuerpos basados en el gen familiar VH3. Además, se espera que los anticuerpos de cadena sencilla VH de camello muestren menor inmunogenicidad que los anticuerpos de cadena sencilla VHH de camello cuando se administran a humanos.

También se apreciará que “anticuerpos de cadena pesada sencilla VH de camello” y “anticuerpos de cadena pesada sencilla VHH de camello” tiene algunas características físicas diferentes que los anticuerpos de cadena dual convencionales. Por ejemplo, debido a la falta de un dominio pesado funcional CH1, los anticuerpos de la presente invención no se enlazan con la molécula complemento C1q que participa en la activación del paso clásico de complemento.

Los anticuerpos de cadena sencilla sustancialmente puros incluyendo fragmentos del mismo de al menos 90 a 95% de homogeneidad son preferibles para la administración a un mamífero, y 98 a 99% o más homogeneidad son más preferibles para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero se trata de un humano. Una vez purificado, parcialmente o hasta el punto de homogeneidad que se desee, los anticuerpos de cadena sencilla aquí descritos pueden usarse diagnósticamente y terapéuticamente (incluyendo extracorporalmente) o para desarrollar y llevar a cabo procesos de ensayos usando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los anticuerpos de cadena sencilla seleccionados normalmente se usarán para prevenir, suprimir o tratar estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacterial o viral, y desórdenes autoinmunes (que incluye, pero no se limitan a, diabetes del tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Chron y miastemia grave), y para prevenir rechazo al transplante. Por ejemplo, depleción de células reguladoras T o interferencia con su reclutamiento puede dar como resultado una respuesta inmune mejorada que puede ser de uso particular en el tratamiento de infecciones que de otro modo se escapan a una respuesta inmune normal.

Además, los anticuerpos de cadena sencilla seleccionados que incluyen fragmentos de los mismos pueden ser útiles para modular una respuesta inmune en regiones de un vertebrado donde no se localizan normalmente. Por ejemplo, uno

o más anticuerpos usados como aquí se describen pueden ser prefusionados, inyectados a un tejido de un vertebrado, usando técnicas conocidas por aquellos especializados en la técnica. La presencia de un anticuerpo como el aquí descrito en un medio ectópico puede ser útil en la modulación de una respuesta inmune durante por ejemplo, rechazo de transplante y similares.

En la aplicación instantánea, el término “prevención” implica administración de la composición protectora antes de la inducción de una enfermedad. “Supresión” se refiere a la administración de la composición después de un hecho inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. El “tratamiento” implica la administración de la composición protectora después de que los síntomas de la enfermedad se hayan hecho aparentes.

Los sistemas modelo de animales que pueden usarse para analizar la eficacia de los anticuerpos seleccionados protegiendo contra o tratando la enfermedad están disponibles. Los métodos para controlar el lupus sistémico eritematoso (SLE) en ratones susceptibles son conocidos en la técnica (Knight *et al.* (1978) *J. Exp. Med.* 147:1653; Reinersten *et al.* (1978) *New Eng. J. Med.*, 299:515). Miastemia Grave (MG) se examina en ratones hembra SJL/J provocando la enfermedad con proteína AchR soluble de otras especies (Lindstrom *et al.* (1988) *Adv. Immunol.*, 42:233). La artritis se provoca en una variedad de ratones susceptible por inyección de colágeno Tipo III (Stuart *et al.* (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42:233). Un modelo por el cual la artritis adyuvante se provoca en ratas susceptibles por inyección de proteína de descarga de calor microbacteriana se ha descrito (Van Eden *et al.* (1988) *Nature*, 331:171). La tiroiditis se provoca en ratones mediante administración de tiroglobulina como se ha descrito (Maron *et al.* (1980) *J. Exp. Med.*, 152:1115). La melitus diabetes dependiente insulina (IDDM) se da de manera natural o puede provocarse en ciertas variedades de ratones como aquellos descritos por Kanasawa *et al.* (1984) *Diabetologia*, 27:113. EAE en ratón y rata sirve como un modelo para MS en humano. En este modelo, la enfermedad desmielinizante es provocada mediante la administración de proteína básica mielina (ver Paterson (1986) *Textbook of Immunopathology*, Mischer *et al.*, eds., Grune y Stratton, New Cork, pp. 179-213; McFarlin *et al.* (1973) *Science*, 179:478; y Satoh *et al.* (1987) *J. Immunol.*, 138:179).

Generalmente, los anticuerpos de cadena sencilla seleccionados se utilizarán en forma purificada junto con portadores farmacéuticamente apropiados. Normalmente, estos portadores incluyen soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo salina y/o medio con búfer. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y de Ringer lactado. Adyuvantes fisiológicamente adecuados, si es necesario mantener un complejo polipéptido en suspensión, pueden elegirse a partir de su grosor como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatas.

Los vehículos intravenosos incluyen elementos de reabastecimiento nutrientes y fluidos y elementos de reabastecimiento de electrolitos, como aquellos basados en dextrosa de Ringer. Conservantes y otros aditivos, como antimicrobiales, antioxidantes, agentes quelatantes y gases inertes, pueden también estar presentes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition).

Los anticuerpos de cadena sencilla seleccionados incluyendo los fragmentos del mismo pueden usarse como composiciones administradas de manera separada o en conjunción con otros agentes. Estos pueden incluir varios fármacos inmunoterapéuticos, como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir “cócteles” de varios citotóxicos u otros agentes en conjunción con los anticuerpos seleccionados, o células T o incluso combinaciones de los anticuerpos seleccionados.

La ruta de administración de composiciones farmacéuticas puede ser cualquiera de aquellas conocidas por aquellos especializados en la técnica. Para terapia, incluyendo sin limitación inmunoterapia, los anticuerpos seleccionados, receptores o proteínas de enlace de los mismos pueden administrarse a un paciente de acuerdo con técnicas estándar. La administración puede ser mediante cualquier manera apropiada, incluyendo parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, transdérmicamente, por medio de ruta pulmonar, o también, de manera apropiada, por infusión directa con un catéter. La dosis y frecuencia de administración dependerá de la edad, sexo y condición del paciente, administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que deben tomarse en cuenta por parte del médico.

Los anticuerpos seleccionados pueden liofilizarse para almacenaje y pueden reconstituirse en un portador adecuado antes del uso. Pueden emplearse técnicas conocidas de liofilización y reconstitución. Se apreciará por parte de aquellos expertos en la técnica que la liofilización y reconstitución pueden dar lugar a grados variados de pérdida de actividad funcional y que los niveles empleados pueden ajustarse hacia arriba para compensar.

Además, los anticuerpos pueden usarse para fines de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos aquí descritos pueden generarse o surgir contra antígenos que se expresan específicamente durante los estados de enfermedad o cuyos niveles cambian durante estados de una enfermedad dada.

Para ciertos fines tales como fines de diagnósticos y de trazado se pueden añadir etiquetas. Etiquetas adecuadas incluyen aunque no limitan cualquiera de las siguientes etiquetas radioactivas, etiquetas espín NMR y etiquetas fluorescentes. Medios para la detección de etiquetas resultarán familiares para aquellos expertos en la técnica.

Ejemplos de etiquetas radioactivas adecuadas incluyen technetium 99m (^{99m}Tc) o yodina-123 (¹²³I). Etiquetas como yodina-123, yodina-313, indio-111, fluorina-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso, o hierro

permitirán la detección de la etiqueta usando NMR. Etiquetas tales como ¹¹C metionina y FDG son adecuadas para uso en técnicas de tomografía por emisión de positrones. Las descripciones de procedimientos y protocolos para usar PET resultan familiares para aquellos expertos en la técnica.

5 Un fluoróforo adecuado es GFP o un mutante del mismo. GFP y sus mutantes puede sintetizarse junto con los anticuerpos o molécula objetivo por medio de expresión con ella como un polipéptido de fusión, de acuerdo con métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, una unidad de transcripción puede construirse como una fusión dentro de una estructura del GFP deseado y la inmunoglobulina u objetivo, e insertarse en un vector como se ha descrito anteriormente, usando técnicas convencionales de donación PCR y de litigación.

10 Los anticuerpos aquí descritos pueden etiquetarse con un agente capaz de generar una señal. La señal puede ser una señal detectable, como la inducción de la expresión de un producto de gen detectable. Ejemplos de productos de gen detectables incluyen polipéptidos bioluminiscentes, como luciferasa y CAT, y polipéptidos detectables mediante ensayos específicos, como beta-galactosidasa y CAT, y polipéptidos que modulan las características de crecimiento de la célula huésped, como enzimas necesarias para el metabolismo como HIS3, o genes de resistencia antibiótica como G418.

15 Las composiciones que contienen los anticuerpos seleccionados o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para llevar a cabo al menos la inhibición parcial, supresión, modulación, eliminación, o algún otro parámetro de medida, de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Cantidades necesarias para lograr esta dosis dependerá de la severidad de la enfermedad y del estado general del sistema inmunológico del paciente, pero generalmente estarán en el rango de 0.00005 a 5.0 mg de anticuerpo de cadena sencilla seleccionado por kilogramo de peso de cuerpo, con dosis de 0.0005 a 2.0 mg/kg/dosis siendo más comúnmente usada. Para aplicaciones 25 profilácticas, las composiciones que contienen los presentes polipéptidos seleccionados o cócteles de los mismos pueden también administrarse en dosis similares o ligeramente inferiores.

Una composición que contiene uno o más anticuerpos seleccionados puede utilizarse en entornos profilácticos y terapéuticos para ayudar a la alteración, inactivación, eliminación o retirada de una población de célula objetivo 30 seleccionada en un mamífero. Además, los repertorios seleccionados de polipéptidos aquí descritos pueden usarse extracorporalmente o *in vitro* selectivamente para eliminar, reducir o sino retirar de manera eficaz una población de células objetivo de una colección heterogénea de células. Sangre de un mamífero puede combinarse extracorporalmente con los anticuerpos seleccionados, receptores de superficie celular o proteínas de enlace de los mismos por medio de las mismas las células no deseadas se elimina o sino se retiran de la sangre para devolverla al mamífero de acuerdo 35 con la técnicas estándar.

Los anticuerpos aquí descritos pueden expresarse en cualquier tipo de célula y puede enlazarse y afectar la función de cualquier componente intracelular. Los componentes intracelulares pueden ser por ejemplo componentes del citoesqueleto, moléculas incluidas en expresión de gen y/o la regulación de expresión, enzimas o moléculas implicadas 40 en la regulación de la función de componentes celulares. Un experto en la técnica apreciará que esta lista no pretende ser exhaustiva. Donde por ejemplo el componente es un inhibidor de enzima, un anticuerpo de la presente invención puede aumentar o disminuir la actividad de la enzima. El punto activo de las enzimas a menudo se localiza en la cavidad más grande de la superficie de las proteínas. Tales puntos normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos convencionales (Novotny *et al.*, (1986) Proc. Nat. Acad USA, 83, 226). La larga curva H3 de los anticuerpos de 45 cadena sencilla penetra profundamente en el punto activo de las enzimas, permitiéndolas que actúen como inhibidores eficientes de enzima.

En particular, los anticuerpos de cadena sencilla, y/o fragmentos y/o composiciones de los mismos pueden ser de uso particular como anti-viral y/o anti-bacterial en aplicaciones externas, por ejemplo, en la forma de cremas para la 50 piel, aplicación vaginal y etcétera. Además, los fragmentos de anticuerpo y composiciones pueden encontrar su uso en equipos de tratamiento, como lugares donde las infecciones oportunistas son prevalentes. Por ejemplo, los anticuerpos, fragmentos de los mismos y composiciones pueden ser de uso particular en ambientes de hospitales, y en particular en unidades de cuidados intensivos. Además, los anticuerpos, fragmentos de los mismos y composiciones pueden encontrar uso en el tratamiento de material de transplantes bien en tejido artificial o natural. Por ejemplo, prótesis 55 médula espinal infectada con CMV u otros virus.

Además, se pueden añadir otras funciones a los anticuerpos aquí descritos como péptidos de transporte y/o moléculas funcionales que proporcionan una actividad enzimática, por ejemplo, quinasas, proteasas, fosfatasa, de-acetilasa, 60 acetilasa, enzimas de ubiquitinización, enzimas de sumolación, metilasas, etc. Además, otros anticuerpos pueden unirse a los anticuerpos de cadena sencilla, o fragmentos de los mismos. Aquellos especializados en la técnica apreciarán que esta lista no pretende ser exhaustiva.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción de un anticuerpo de cadena pesada sencilla VHH en un mamífero transgénico no humano que comprende el paso de expresar un locus de cadena pesada VHH heterólogo en dicho mamífero, donde el locus de cadena pesada VHH está formado por una región VHH, una región J, una región D y una región de cadena pesada constante, donde la región de cadena pesada constante, cuando se expresa, no expresa un dominio funcional CH ni un dominio funcional CH4.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde el locus de cadena pesada VHH está formado por al menos una región D de origen humano y al menos una región J de origen humano.
- 15 3. Un método para la producción de un anticuerpo de cadena pesada sencilla VH de camello en un mamífero transgénico no humano que comprende el paso de expresar un locus de cadena pesada VH de camello en dicho mamífero, donde el locus de cadena pesada VH de camello está formado por una región VH de camello, una región J, una región D y una región de cadena pesada constante, donde la región de cadena pesada constante, cuando se expresa, no expresa un dominio funcional CH ni un dominio funcional CH4.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, donde el locus de cadena pesada VH de camello está formado por al menos una región D de origen humano y al menos una región J de origen humano.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la región de cadena pesada constante comprende uno o más exones de cadena pesada constante seleccionados del grupo consistente en C_{δ} , $C_{\gamma}1-4$, C_{ϵ} y $C_{\alpha}1-2$.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, donde sólo uno o más genes $C_{\gamma}2$ y/o $C_{\gamma}3$ con dominios no funcionales CH1 están presentes en la región de cadena pesada constante.
- 35 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la región de cadena pesada constante comprende al menos un gen de cadena pesada constante que es de origen camélido.
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la región de cadena pesada constante comprende al menos un gen de cadena pesada constante que es de origen no-camélido.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, donde la región de cadena pesada constante comprende al menos un gen de cadena pesada constante que es de origen humano.
- 50 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el locus de cadena pesada VHH o VH de camello además comprende una secuencia de recombinación (rss) capaz de recombinar una región J directamente con un gen de cadena pesada constante.
- 55 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el locus de VHH o VH de camello expresa un anticuerpo de cadena pesada sencilla híbrido.
- 60 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los locus de cadena pesada endógenos al mamífero se eliminan o silencian.
- 65 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende inmunizar al mamífero transgénico no humano con un antígeno de tal modo que se obtenga una respuesta inmune contra el antígeno dando como resultado la generación de un anticuerpo monoclonal o policlonal de cadena pesada sencilla específica madurado por afinidad.
14. El método de la reivindicación 13, que además comprende la preparación de hibridomas y la producción y el análisis de anticuerpos específicos de cadena pesada sencilla que producen células.
15. El método de la reivindicación 13, que además comprende el aislamiento de secuencias de ácido nucleico de animales transgénicos inmunizados para la producción de anticuerpos específicos de cadena pesada sencilla, o fragmentos de los mismos, usando técnicas de ADN recombinante.
16. El método de la reivindicación 15, que además comprende el uso de técnicas fago y protocolos para generar, propagar y analizar anticuerpos específicos de cadena pesada sencilla, o fragmentos de los mismos.
17. El método de la reivindicación 15, que además comprende la producción de grandes cantidades de anticuerpos específicos de cadena pesada sencilla, o fragmentos de los mismos, usando cultivo celular bacteriana, de levadura o de mamífero.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el mamífero transgénico no humano es un ratón.

ES 2 284 863 T3

19. Un vector que comprende un locus de cadena pesada VHH o un locus de cadena pesada VH de camello como se ha definido en las reivindicaciones 1 a 11.

20. Una célula huésped transformada con un locus de cadena pesada VHH o un locus de cadena pesada VH de camello como se ha definido en las reivindicaciones 1 a 11.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

■ Locus Humano
■ Locus de Llama o Camello

Fragmento de Inyección en ratón IgM ratones KO
Aproximadamente 220kb

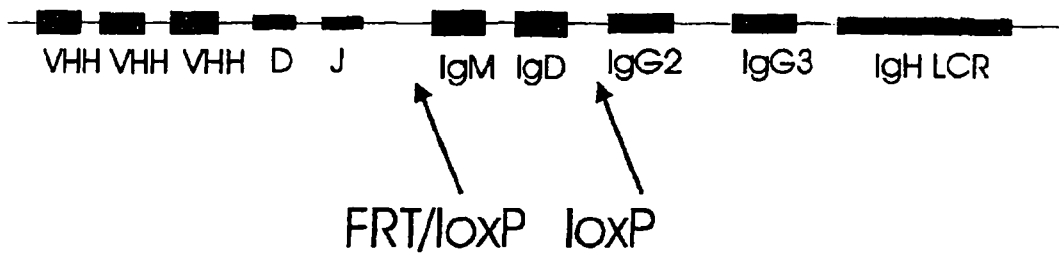


FIGURA 1