

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 321**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2010 E 10711069 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2411408**

54 Título: **Anticuerpos solubles "solo de cadena pesada"**

30 Prioridad:

24.03.2009 GB 0905023

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.03.2016

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (50.0%)
Department of Cell Biology and Genetics,P.O.Box
1738
3000 DR Rotterdam, NL y
CRAIG, ROGER KINGDON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GROVELD, FRANKLIN, GERARDUS;
JANSSENS, RICHARD, WILHELM;
DRABEK, DUBRAVKA;
CHEN, TAO;
DE BOER, ERNIE y
CRAIG, ROGER, KINGDON**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 563 321 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).

Anticuerpos solubles “solo de cadena pesada”**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos mejorados para aislar a partir de mamíferos no humanos transgénicos un repertorio diverso de anticuerpos solo de cadena pesada, solubles, funcionales, y dominios de VH solubles derivados de los mismos que son estructuralmente distintos de los dominios de VH derivados de anticuerpos que comprenden cadenas pesadas y ligeras. Los anticuerpos solo de cadena pesada y dominios de VH solubles se derivan de células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria.

Antecedentes de la invención

15 Los anticuerpos monoclonales o variantes de los mismos representarían una alta proporción de medicinas nuevas lanzadas en el siglo XXI. La terapia de anticuerpos monoclonales ya es aceptada como una vía preferida para el tratamiento de artritis reumatoide y enfermedad de Crohn y hay un progreso notable en el tratamiento del cáncer. Los productos basados en anticuerpos también están en desarrollo para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares e infecciosas. Los productos de anticuerpos monoclonales más comercializados reconocen y se unen a un solo epítotope bien definido en el ligando objetivo (por ejemplo, TNF α).

La estructura de los anticuerpos es bien conocida en la técnica. La mayoría de los anticuerpos naturales son tetraméricos y comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cadenas pesadas se unen una a otra mediante enlaces disulfuro entre dominios bisagra localizados aproximadamente a la mitad a lo largo de cada cadena pesada. Una cadena ligera está asociada con cada cadena pesada en el lado del extremo N del dominio bisagra. Cada cadena ligera está normalmente unida a su cadena pesada respectiva mediante un enlace disulfuro cerca del dominio bisagra.

Cuando una molécula de anticuerpo está correctamente plegada, cada cadena está plegada en un número de dominios globulares distintos unidos por una secuencia de polipéptidos más lineal. Por ejemplo, la cadena ligera está plegada en un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). Las cadenas pesadas tienen un solo dominio variable (VH) adyacente al dominio variable (VL) de la cadena ligera, un primer dominio constante (CH1), un dominio bisagra y dos o tres dominios constantes adicionales. La interacción de dominios variables de cadena pesada (VH) y cadena ligera (VL) produce la formación de una región de unión a antígeno (Fv).

La interacción entre las cadenas pesada y ligera está mediada por el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1) y el dominio constante (CL) de la cadena ligera. Sin embargo, también hay una interfase entre el dominio variable de cadena pesada (VH) y el dominio variable de cadena ligera (VL) que participa en la interacción entre la cadena pesada y la cadena ligera.

Como los dominios variables tienen secuencias de aminoácidos variables, se ha contemplado un sistema para numerar los residuos de aminoácidos en estos dominios. Este sistema de numeración se describe por Kabat et al. ((1991) US Public Health Services, publicación de NIH 91-3242) y se usa en la presente memoria descriptiva. En el dominio variable de cadena pesada, la región estructural 1 (FR1) incluye los residuos 1 a 30, la región estructural 2 (FR2) incluye los residuos 36 a 49, la región estructural 3 (FR3) incluye los residuos 66 a 94 y la región estructural 4 (FR4) incluye los residuos 103 a 113. Por tanto, en el dominio variable de cadena pesada, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) incluyen los residuos 30 a 35 (CDR1), residuos 50 a 65 (CDR2) y residuos 95 a 102 (CDR3).

Los linfocitos B humanos normales contienen un solo locus de cadena pesada en el cromosoma 14 a partir del cual se produce el gen que codifica una cadena pesada por reordenamiento. En el ratón, el locus de cadena pesada está localizado en el cromosoma 12. Un locus de cadena pesada normal comprende una pluralidad de segmentos de gen V, un número de segmentos de gen D y un número de segmentos de gen J. La mayor parte de un dominio VH está codificada por un segmento de gen V, pero el segmento del extremo C de cada dominio VH está codificado por un segmento de gen D y un segmento de gen J. El reordenamiento de VDJ en linfocitos B, seguido por maduración por afinidad, proporcionan a cada dominio VH su especificidad de unión a antígeno. El análisis de secuencia de anticuerpos tetraméricos normales demuestra que la diversidad resulta principalmente de una combinación de reordenamientos de VDJ e hipermutación somática (Xu y Davies, (2000) Immunity, 13, 37-45). Existen más de 50 segmentos de gen V humano presentes en el genoma humano de los cuales solo 39 son funcionales. En linfocitos B productores de anticuerpos diploides normales, cada célula produce un anticuerpo tetramérico a partir de un solo conjunto de loci de anticuerpo de cadena pesada y ligera. El otro conjunto de loci se usa, pero no productivamente, como el resultado de un proceso llamado exclusión alélica (véase Singh et al., (2003) J. Exp. Med., 197, 743-750 e Immunology 5ª edición, R. Goldsby, T. Kindt, B. Osborne, J. Kuby (2003) W. H. Freeman and Company NY, NY y referencias en los mismos).

La capacidad para “recordar” encuentros con patógenos es una característica definitoria del sistema inmunológico en

vertebrados superiores. La contribución de linfocitos B a la “memoria” parece ser una función de dos poblaciones de linfocitos B distintas, células plasmáticas de vida larga y linfocitos B de memoria (para revisión véase Tangye y Tarlinton (2009) Eur. J. Immunol., (2009) 39, 2065-2075). Éstas son generadas como resultado de la respuesta inmunitaria primaria inicial (exposición al antígeno) de linfocitos B intactos. Una población está representada por células plasmáticas de vida larga, linfocitos B que continúan secretando altos niveles de anticuerpo neutralizante durante largos periodos (meses) después de que el antígeno haya sido eliminado. Las células plasmáticas son terminalmente diferenciadas y comprenden loci de inmunoglobulina madurados por afinidad, reordenados que codifican anticuerpos específicos de antígeno de alta afinidad. Esto contrasta con las células plasmáticas de vida corta, con un ciclo de vida de algunos días, que mueren como resultado de estrés causado por la producción masiva de anticuerpo específico de antígeno (véase Radbruch et al. (2006) Nature Reviews Immunology, 6, 741-750). Por el contrario, la segunda población de linfocitos B de memoria específicos de antígeno representan una población de linfocitos B que también comprende loci de inmunoglobulina madurados por afinidad, reordenados, que codifican anticuerpos específicos de antígeno de alta afinidad, pero que no secretan anticuerpos a niveles elevados. Los linfocitos B de memoria tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse rápidamente en células plasmáticas que secretan anticuerpo después de la exposición recurrente al antígeno inmunizante inicial. Esto produce el enriquecimiento rápido del conjunto de inmunoglobulina específica de antígeno disponible para responder a una exposición a antígeno dada. El trabajo sobre la vacuna de la viruela demuestra una respuesta de linfocitos B de memoria en individuos inmunizados durante un periodo de 50 años (Crotty et al. (2003) J. Immunology, 171, 4969-4973).

En seres humanos, los linfocitos B de memoria sobreviven en órganos linfoides secundarios, comprenden genes de inmunoglobulina somáticamente mutados reordenados y median en respuestas inmunitarias secundarias al re-exponerse (véase Bernasconi et al. (2002) Science, 298, 2199- 2202). El bazo humano en particular parece ser un sitio importante para los linfocitos de memoria (para revisión, véase Tangye y Tarlinton (2009) Eur. J. Immunol. (2009), 39, 2065-2075).

Las células plasmáticas que secretan anticuerpo de vida larga sobreviven en órganos linfoides secundarios y médula ósea durante meses. Por ejemplo, las células que secretan inmunoglobulina seleccionadas por antígeno persisten en el bazo y médula ósea humanos (Ellyard et al. (2004) Blood, 103, 3805-3812).

En otros mamíferos, tales como el ratón, la respuesta de anticuerpo de largo plazo primaria parece ser una función de las células plasmáticas de vida larga. Así, en el ratón, las células plasmáticas de vida larga terminalmente diferenciadas presentes en médula ósea y bazo sobreviven y continúan secretando anticuerpos durante periodos de tiempo prolongados, más de un año (véase Slifka et al. (1998) Immunity, 8, 363-372; Maruyama et al. (2000) Nature, 407, 636-641). Aunque queda por establecer con certeza la relación precisa entre las células de memoria y las células plasmáticas de vida larga terminalmente diferenciadas en diferentes mamíferos, dos conjuntos de linfocitos B de vida larga existen en mamíferos, comprendiendo cada uno loci de inmunoglobulina madurada por afinidad, reordenada, que codifican anticuerpos específicos de antígeno de alta afinidad. Uno tiene la capacidad de dividirse rápidamente. El otro no se divide, pero retiene la capacidad de secretar anticuerpo durante periodos largos.

Los anticuerpos tetraméricos humanos específicos de antígeno producidos por pacientes proporcionan una posible fuente de anticuerpos específicos de antígeno clínicamente y comercialmente relevantes. Estos también pueden derivarse directamente de linfocitos B humanos transformados por EBV, preferentemente de linfocitos B de memoria humanos transformados por EBV, opcionalmente transformados en presencia de activadores de linfocitos B policlonales (documento PCT/IB04/01071).

Zou et al. (2007, J. Experimental Medicine, 204(13): 3271-3283) investiga la producción de anticuerpos solo de cadena pesada en el suero de ratones deficientes en cadena ligera.

Hasta ahora, las células de memoria y las células plasmáticas de vida larga no se han utilizado como una fuente de anticuerpos de alta afinidad codificados por transgén, en particular anticuerpos humanos o anticuerpos híbridos que comprenden dominios VH y VL humanos.

Ingeniería de dominio VH y anticuerpos solo de cadena pesada

La capacidad de los anticuerpos solo de cadena pesada desprovistos de cadena ligera para unirse a antígeno se estableció en la década de los 60 (véase Jaton et al. (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195). La inmunoglobulina de cadena pesada físicamente separada de la cadena ligera retuvo el 80 % de actividad de unión a antígeno en relación con el anticuerpo tetramérico. Además, la actividad de unión se asoció a un fragmento del extremo amino (Fd) de la cadena pesada. Aunque estos experimentos usaron anticuerpo policlonal de conejo, específico de antígeno, bien caracterizado, son representativos de cualquier población policlonal que comprende un anticuerpo tetramérico de origen de mamífero, incluyendo humano. El dímero de cadena pesada retuvo el dominio de unión de cadena ligera CH1.

En los 80, varias publicaciones describieron la manipulación *in vitro* de genes de cadena pesada para construir anticuerpos novedosos. Una gran parte de este trabajo se basó en un gen μ de anticuerpo de ratón reordenado

(IgM) que codificaba un anticuerpo producido contra un antígeno bien caracterizado. Una característica de este anticuerpo fue que se sabía que la especificidad de unión a antígeno residía en el dominio VH, ya que el ensamblaje y la secreción con una cadena ligera irrelevante mostró retención de la unión a antígeno (véase Neuberger y Williams (1986) Phil. Trans. R. Soc. Lond., A317, 425-432). Usando este sistema, se mostró que un dominio de unión de VH específico de antígeno de ratón podría usarse para derivar un anticuerpo novedoso que comprendía una región constante ϵ humana fusionada a un dominio VH específico de antígeno de ratón. La IgE quimérica resultante retuvo especificidad de antígeno y mostró actividad efectora esperada de una IgE (véase Neuberger et al. (1985) Nature, 314, 268-270).

Otros ejemplos en la bibliografía de ingeniería de cadena pesada incluyen la producción de un anticuerpo quimérico de ratón-humano que comprende un VH de ratón fusionado a regiones constantes de IgA o IgG humanas (véanse Morrison et al. (1984) PNAS, 81, 6851-6855; Sun et al. (1987) PNAS, 84, 214-218); y Heinrich et al. (1989) J. Immunol., 143, 3589- 97). Así, a fines de la década de los 80, el concepto de ingeniería de cadena pesada estaba bien establecido. Cualquier dominio de unión VH caracterizado podía fusionarse con cualquier región constante de anticuerpo, produciendo la retención de actividad de unión específica de antígeno. La función efectora se determinó por la región constante de cadena pesada seleccionada (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, etc.). El anticuerpo quimérico expresado final en todos los casos comprendió un anticuerpo tetramérico.

Para manipular por ingeniería una cadena pesada completamente humana se requiere una fuente de dominios VH humanos de especificidad de unión definida. Este problema se resolvió parcialmente mediante el desarrollo de bibliotecas de matrices de dominio de unión de VH humano derivadas usando combinaciones de segmentos V, D y J humanos de línea germinal intactos o dominios VH madurados por afinidad derivados de anticuerpos tetraméricos obtenidos de linfocitos humanos. Los dominios de VH específicos de antígeno con afinidades de unión en el intervalo de 20 nM a 100 nM podrían entonces aislarse de bibliotecas de presentación de dominio de unión de VH derivadas del ARNm de linfocitos B de sangre periférica productores de anticuerpos humanos (véase Ward et al. (1989) Nature, 341, 544-546) o de matrices de VDJ aleatorias derivadas de ADN de línea germinal humana intacta (véase el documento EP-A-0 368 684). Estos enfoques proporcionaron una fuente de dominios VH de mamífero específicos de antígeno en particular dominios VH humanos.

Se propuso que:

“Los dominios variables aislados (VH) podían ofrecer una alternativa a anticuerpos monoclonales y servir como una llave para la construcción de anticuerpos humanos de alta afinidad”;
 “Uniendo dominios variables a dominios constantes de cadena ligera o cadena pesada adecuados y que expresan los genes ensamblados en células de mamífero, podían hacerse anticuerpos completos y debían poseer funciones efectoras naturales tales como lisis de complemento”; y
 “Este enfoque podría probar ser valioso para construir anticuerpos humanos de valor terapéutico” (véase Ward et al. (1989) Nature, 341, 544-546 y el documento EP-A-0 368 684).
 Usando un enfoque alternativo, Sitia et al. ((1990) Cell, 60, 781 - 790) demostraron que la eliminación del dominio CH1 de un gen μ de ratón reordenado produjo la síntesis y secreción de anticuerpo solo de cadena pesada desprovisto de cadena ligera por células de mamífero en cultivo. En este caso, la cadena pesada secretada comprendía un dominio de unión de VH y una región constante que consistía en un dominio bisagra flexible y dominios constantes CH2, CH3 y CH4 de IgM, proporcionando la dimerización y función efectora de cadena pesada.

Así, por 1990, las herramientas básicas estaban disponibles para la ingeniería *in vitro* de homodímeros de anticuerpo solo de cadena pesada humanos (algunas veces descritos como Dabs-Fc) con especificidades de unión de VH definidas y una elección de regiones efectoras de cadena pesada desprovistas de CH1.

El problema con el enfoque fue doble:

Dominios VH seleccionados por enfoques de matriz fueron de afinidad de unión a antígeno relativamente baja (20-100 nM); y dominios VH en ausencia de cadena ligera fueron “pegajosos”, insolubles y propensos a la agregación, y no tan adecuados para aplicaciones farmacéuticas.

La tendencia para que los dominios VH aislados se agregaran es una consecuencia de la ausencia de cadena ligera. Cuando la cadena ligera está ausente, ciertas cadenas laterales hidrófobas que normalmente están enterradas dentro de la interfase cadena pesada/ligera se exponen. Además, se compromete la estabilidad termodinámica ya que la estabilidad de dominios VH depende de contactos en la interfase de cadena ligera (véase Worn y Pluckthun (1999) Biochemistry, 38, 8739-8750).

La descripción por Hamers-Casterman de un anticuerpo solo de cadena pesada homodimérico de IgG que existe de forma natural desprovisto de cadena ligera que circula en camélidos, además de anticuerpo tetramérico de camélido normal (véase Hamers-Casterman et al. (1993) Nature, 363, 446- 448) proporcionó una perspectiva en el problema de solubilidad. Consistente con la molécula genéticamente manipulada por Sitia et al. ((1990) Cell, 60, 781- 790), la

funcionalidad del dominio CH1 estuvo ausente en anticuerpos solo de cadena pesada de camélido debido a un sitio de corte y empalme alternativo que eliminó CH1 del ARNm de cadena pesada de anticuerpo procesada.

5 Los dominios VH de anticuerpos solo de cadena pesada de camélido (que de aquí en adelante se refieren como dominios VHH, según el uso común) derivados por exposición a antígeno se maduran por afinidad en linfocitos B *in vivo*, tienen afinidades de unión en el intervalo nanomolar bajo, son solubles y no son propensos a la agregación (véase Ewert et al. (2002) *Biochemistry*, 41, 3628-3636). Los dominios VHH de camélido también muestran
10 generalmente elevada estabilidad al calor en relación con dominios VH derivados de línea germinal aislados por enfoques de presentación y algunos que tienen la actividad de unión en presencia de agentes desnaturalizantes tales como detergentes y agentes blanqueantes, y después tratamiento con calor (véase Dumoulin et al. (2002) *Protein Science*, 11, 500-511 y Dolk et al. (2005) *Applied Environmental Microbiology*, 71, 442-450).

15 Los anticuerpos solo de cadena pesada específicos de antígeno pueden recuperarse de ARNm de linfocitos B de camélido por tecnología de clonación estándar o por tecnología de presentación en fagos u otra tecnología de presentación (véase Riechmann y Muyldermans (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38). Los anticuerpos solo de cadena pesada derivados de camélidos son de alta afinidad. El análisis de secuencia de ARNm que codifica anticuerpo solo de cadena pesada demuestra que la diversidad resulta principalmente de una combinación de reordenamiento de VHHDJ e hipermutación somática, como también se observa en la producción de anticuerpos tetraméricos normales. Sin embargo, queda por establecer si la producción por camélidos de anticuerpos solo de
20 cadena pesada, a diferencia de los anticuerpos tetraméricos, es por linfocitos B normales. De hecho, se sabe poco acerca del desarrollo de pre-linfocitos B en camélidos (véanse los documentos WO2004/049794 y Zou et al. (2005) *J. Immunology*, 175, 3769-3779). Además, queda por establecer si los anticuerpos solo de cadena pesada de camélido, como tetrámeros de inmunoglobulina que comprenden cadena pesada y ligera, participan o no en respuestas de anticuerpo a largo plazo por células de memoria o células plasmáticas de vida larga.

25 Una característica particular de los anticuerpos solo de cadena pesada de camélido es que algunos residuos de aminoácidos que, en un dominio VH normal, interaccionan con el dominio VL, están mutados en un dominio VHH. Así, la leucina encontrada en la posición 45 en el 98 % de las secuencias de VH humanas y murinas ha estado mutada. Se ha propuesto que estas mutaciones de camélido, que se conservan en la línea germinal, son
30 consistentes con el mantenimiento de la solubilidad de VHH en ausencia de cadena ligera. También se han descrito otras mutaciones de aminoácido distintivas en dominios VHH de camélido, en comparación con dominios VH normales. De éstos, los cambios más comunes e importantes ocurren en cuatro posiciones (tétrada de VHH) en la segunda región estructural y funcionan reduciendo el carácter hidrófobo de la interfase de cadena ligera anterior. Generalmente, Glu-44 y Arg-45 se encuentran en lugar de Gly-44 y Leu-45 menos hidrófilos presentes en dominios
35 VH normales, mientras que el carácter hidrófilo en la posición 47 aumenta por la sustitución de Trp con residuos más pequeños. El cuarto cambio requiere la sustitución de Val-37 por Phe o Tyr. El análisis estructural revela que esto produce nucleación de un núcleo hidrófobo pequeño que implica normalmente a Tyr-91, Trp-103, Arg-45 y residuos hidrófobos presentes en el bucle CDR3 del dominio VHH. Estos cambios aumentan el carácter hidrófilo de la interfase de cadena ligera anterior por sustitución directa con cadenas laterales más hidrófilas o por secuestro de
40 cadenas laterales hidrófobas de disolvente por interacción entre CDR3 y residuos de la región estructural (véase Bond et al. (2003) *J. Mol. Biol.*, 332, 643-655).

45 En el dominio VHH, el bucle CDR3 está agrandado en relación con aquel presente en anticuerpos tetraméricos de camélido y otros anticuerpos tetraméricos bien caracterizados de ser humano y ratón (véase Riechmann y Muyldermans (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38). El papel de los residuos hidrófobos clave presentes en el bucle CDR3 de VHH, por ejemplo en el dominio VHH de llama, demuestra un papel estructural para CDR3 en la estabilidad y solubilidad de dominios VHH (véase Bond et al. (2003) *J. Mol. Biol.*, 332, 643-655). En conjunto, estudios estructurales sobre dominios VHH demuestran que la estabilidad y solubilidad de estos dominios son dependientes de CDR3, además de residuos de la región estructural, y que el requerimiento para residuos hidrófobos clave pone restricciones significativas al tipo de bucle CDR3 compatible con las características biofísicas favorables de dominios VHH en relación con dominios VH (véase Barthelemy et al. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 3639-3654).

55 Sin embargo, a pesar de un alto grado de conservación de secuencia entre camélidos y el hombre, los dominios VHH de camélido siguen siendo de origen camélido y, por lo tanto, son posiblemente antigénicos en el hombre. La humanización *in vitro* puede disminuir este riesgo, pero a costa de la afinidad y solubilidad potencialmente disminuidas como resultado de la manipulación por ingeniería *in vitro* implicada.

Dominios de unión de VH humano y el problema de la solubilidad

60 Las malas características biofísicas de dominios VH humanos y de otros mamíferos derivados de secuencias de línea germinal o de anticuerpos tetraméricos normales en relación con dominios VHH de camélido, en particular la tendencia a agregarse, limitan actualmente su utilidad como reactivos, diagnóstico y como medicinas (véanse Rosenberg (2006) *The AAPS Journal*, 8(3), Artículo 59 E501-E507 y Fahrner et al. (2001) *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, 18, 301-327).

Intentos iniciales para resolver los problemas de solubilidad se basaron en la introducción de secuencias de aminoácidos camelizantes en regiones de unión de VH humanas seleccionadas en la interfase VH/VL. Este enfoque ha demostrado ser decepcionante, ya que la estabilidad y solubilidad no pueden tratarse por la "camelización" en la posición 45 de la interfase VH/VL sola (véanse las presentaciones de Domantis con fecha de 18 de mayo de 2007 y 5 de junio de 2007 en oposición al documento EP-B-0 656 946). De hecho, la introducción de mutaciones "camelizantes" dirigidas no es suficiente para resolver problemas de "adhesión" en dominios VH humanos aislados (véase Riechmann y Muyldermans (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38). La introducción de mutaciones camelizantes conduce a deformaciones en la hoja β plegada de la región estructural potencialmente responsable de la estabilidad de proteína reducida observada como resultado de estos experimentos (véase Riechmann (1996) J. Mol. Biol., 259, 957-969). Además, el papel de CDR3, que comprende residuos hidrófobos clave, en el mantenimiento de la estabilidad y solubilidad estructural de dominios VHH en ausencia de cadena ligera se añade a la complejidad, limitando posiblemente la diversidad de secuencias de CDR3 a aquellas compatibles con la región estructural de camélido (véase Barthelemy et al. (2008) J. Biol. Chem., 283, 3639-3654).

Así, los dominios VH de mamífero, incluyendo aquellos de humano, derivados de anticuerpos tetraméricos naturales madurados por afinidad o de matrices intactas de segmentos VDJ de línea germinal son, en ausencia de cadena ligera, relativamente insolubles y propensos a agregación. Dichos dominios VH carecen de las características biofísicas necesarias de un dominio VH soluble adecuado para usarse como medicinas.

Anticuerpos solo de cadena pesada y dominios VH humanos solubles generados *in vivo* por transgénesis

Para aplicaciones farmacéuticas, los dominios de unión de VH solubles serán preferentemente de origen humano con características tales como afinidad de unión a antígeno alta y solubilidad bajo condiciones fisiológicas en ausencia de agregación. Tales dominios de unión a VH solubles también pueden usarse como diagnósticos y reactivos y tendrán aplicaciones amplias en la industria y agricultura.

Un enfoque alternativo para generar antígenos solo de cadena pesada específicos de antígeno es usar ratones transgénicos que comprenden loci de cadena pesada desprovistos de funcionalidad CH1 (véase Janssens et al. (2006) PNAS, 103:15130-5 y WO02/085944).

Al principio, no se sabía si los linfocitos B murinos normales serían activados y secretarían anticuerpos solo de cadena pesada como resultado de la exposición a antígeno o si tales anticuerpos demostrarían ser solubles. Además, no se sabía si IgM se requería o, como en el camélido, si la expresión sería limitada a las clases Ig γ 2 e Ig γ 3 de anticuerpo, o incluso si los dominios VH potencialmente insolubles podrían ser secretados por linfocitos B murinos normales.

Janssens et al. ((2006) PNAS, 103:15130-5) describen un locus de gen de cadena pesada quimérico que comprende dos segmentos de gen VHH de llama, codificando todos los segmentos de gen D y J y combinaciones de segmentos de gen regiones constantes C μ y C γ 2 y C γ 3 humanas, careciendo todas de la funcionalidad CH1. La elección de los segmentos de gen VHH de llama aseguraron que las mutaciones de región estructural de línea germinal mantenidas en camélidos en la interfase VH/VL también están presentes en el locus humano camelizado expresado para potenciar la posibilidad de que el dominio VH "camelizado" resultante pudiera retener las características de solubilidad y estabilidad mostradas por el VHH de camélido, aumentando así la probabilidad de una respuesta funcional a la exposición a antígenos incluso en ausencia de un bucle CDR3 derivado de camélido.

El resultado demostró que un transgén de anticuerpo solo de cadena pesada se expresa de una manera específica de linfocitos B, que la expansión de linfocitos B ocurre y que, en ausencia de funcionalidad CH1, la presencia de cualquier gen de cadena ligera funcional es irrelevante. Los transgenes solo de cadena pesada experimentan reordenamiento de VDJ, seguido por activación de linfocitos B y maduración por afinidad en respuesta a exposición a antígeno. El cambio de clase entre IgM e IgG solo de cadena pesada también ocurre, como lo hace el cambio de isotipo C γ . En ausencia de C μ del locus, C μ se usa igualmente bien. La especificidad de los anticuerpos se determina en gran medida por el reordenamiento de VDJ (CDR3), mientras que el análisis de mutaciones somáticas muestra que éstos ocurren en toda la región VH, con preferencia para las regiones CDR1 y CDR2 del segmento de gen VHH de llama expresado. Del número limitado de anticuerpos solo de cadena pesada humanos camelizados caracterizados, todos demostraron ser solubles ya sea que fueran derivados de linfocitos B del bazo por presentación en fagos de dominios VH o por selección de hibridoma, a pesar del hecho de que el bucle CDR3, que se derivó completamente de secuencias humanas, fue más pequeño que aquellos encontrados en dominios VHH de camélido.

Los mejores anticuerpos solo de cadena pesada híbridos de llama/humano de esta serie limitada tenían afinidades en el intervalo de 1-3 nM. El ratón también trata el transgén como otro locus de cadena pesada porque la expansión de linfocitos B y la arquitectura del bazo es esencialmente normal incluso en ausencia de reordenamiento de cadena ligera (véase Janssens et al. (2006) PNAS, 103:15130-5). Además, los mecanismos de exclusión alélica determinan si el locus de cadena pesada de ratón endógeno o el transgén de cadena pesada que carece de funcionalidad CH1 se expresa productivamente (véase el documento WO2007/09677).

Las observaciones de Janssens et al. ((2006) PNAS, 103:15130-5) demuestran sorprendentemente que los anticuerpos solo de cadena pesada camelizados, solubles, estables, pueden derivarse usando una región estructural de camélido, incluso en ausencia de bucle CDR3 que comprende secuencias de camélido.

5 Como una extensión de estos experimentos (véase el documento WO2006/008548), se han construido líneas de ratón transgénicas adicionales que comprenden *loci* de gen solo de cadena pesada completamente humanos, y así carecen de secuencia que codifica la región estructural VHH de camélido y, además, comprenden bucles CDR3 derivados de secuencias que no son de camélido.

10 En este enfoque se han introducido cuatro segmentos de gen VH de línea germinal humana natural (locus natural V4), basándose así completamente en la selección natural a través de la maduración por afinidad para la generación de especificidad de antígeno y estabilidad estructural de los dominios VH humanos solubles resultantes. Ambos loci comprenden todos los segmentos de gen D y J, segmentos de gen de región constante C γ 2 y C γ 3 humanos, careciendo cada uno de CH1, los elementos reguladores del potenciador de inmunoglobulina humana y preferentemente la LCR de cadena pesada de anticuerpo.

15 El locus V4 humano es funcional y los anticuerpos solo de cadena pesada humanos circulan en el plasma de animales no expuestos. Tras la exposición a antígeno, los anticuerpos humanos específicos de antígeno se detectan usando ensayos de ELISA rutinarios. Los loci humanos que comprenden segmentos de gen V manipulados por ingeniería (locus V17) (véase también el documento WO2008/035216) son también funcionales (véase también The Antibody Engineering and Antibody Therapeutics Meeting. F. Grosveld presentation, San Diego Antibody Meeting, 3-4 de diciembre de 2007).

20 Además, sorprendentemente, la exposición a antígeno de ratones transgénicos que comprenden loci V4 permite el aislamiento y la caracterización de dominios VH humanos de alta afinidad, específicos de antígeno, solubles, en ausencia de la línea germinal de mutaciones de región estructural distintivas de camélido y el bucle CDR3 similar a camélido típico de dominios VHH de camélido. Además, los dominios VH derivados de anticuerpos solo de cadena pesada humanos específicos de antígeno son solubles (véase el documento WO2006/008548). Tras la exposición a antígeno, el reordenamiento de VDJ y la posterior expansión de linfocitos B, la arquitectura del bazo en ratones que comprenden el locus V4 humano es esencialmente similar a una respuesta de inmunoglobulina de ratón no mutante a la exposición a antígenos. La microscopía óptica muestra segregación de la agrupación de linfocitos T en la hoja de linfocitos peri-arteriolar (PALS) rodeada por áreas ricas en linfocitos B que contienen folículos y zonas marginales presentes en los límites externos de la pulpa blanca. También hay estructuras similares a centros germinales en folículos de linfocitos B de tejidos linfoides secundarios comparables a ratones no mutantes durante las respuestas de anticuerpo dependientes de linfocitos T.

25 Puede derivarse un enfoque de presentación alternativo a la identificación y la manipulación por ingeniería de dominios VH humanos sintéticos que no depende de análisis predictivo de secuencias de dominio VHH de camélido naturales también demuestra que los dominios VH autónomos con propiedades estructurales más allá del alcance de las regiones estructurales naturales usando mutaciones no naturales que difieren de aquellas encontradas en camélido (véase Barthelemy et al. (2008) J. Biol. Chem., 283, 3639-3654 y la solicitud de patente de E.E.UU. número 11/102.502). Sin embargo, los datos no demuestran si tales dominios VH retienen o no las características biofísicas de solubilidad bajo condiciones fisiológicas en ausencia de agregación en combinación con afinidades de unión en el intervalo nanomolar bajo.

30 Enfoques para la identificación y manipulación por ingeniería de dominios VH humanos sintéticos por presentación, aunque son buenos, son laboriosos y están limitados en alcance a la disponibilidad de dominios VH humanos e información estructural tridimensional de VHH de camélido. Diferencias sutiles serán evidentes dependiendo de las combinaciones de VDJ usadas, que limitarán el desarrollo de bibliotecas de VH basadas en matriz sintéticas con diversidades de CDR3 no restringidas por demandas estructurales que mantienen la unión a antígeno de alta afinidad. Aunque los resultados demuestran que, a diferencia de los dominios VHH de camélido, conformaciones estables solubles de dominios VH humanos no dependen de interacciones entre el bucle CDR3 y las sustituciones de aminoácidos distintivas de camélido en la interfase de cadena ligera anterior, los datos están limitados a características biofísicas. Por ejemplo, no se ha considerado el mantenimiento de unión a antígeno de alta afinidad en el contexto de estos cambios.

La invención

35 La invención proporciona un método de producción de un anticuerpo solo de cadena pesada que se une específicamente a un antígeno que comprende:

- 40 (a) inmunizar un mamífero transgénico no humano con el antígeno, en el que el mamífero expresa anticuerpos solo de cadena pesada que carecen de un dominio CH1 en el ARNm de cadena pesada transcrito y procesado, y en el que los anticuerpos solo de cadena pesada se expresan de un locus transgénico en el mamífero;
- 45 (b) aislar células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria del mamífero inmunizado;
- 50 (c) aislar una población de ARNm de células derivadas de la etapa (b);

- (d) clonar una población de ADNc derivado del ARNm aislado en la etapa (c) en un vector de expresión y que expresa el vector de expresión en una línea celular;
- (e) seleccionar por lo menos una línea celular que produce un anticuerpo solo de cadena pesada que se une específicamente al antígeno;

5

en el que el mamífero es un ratón o una rata.

La invención también proporciona un método de producción de un dominio V_H soluble o una proteína de fusión V_H que se une específicamente a un antígeno que comprende:

10

- (a) inmunizar un mamífero transgénico no humano con el antígeno, en el que el mamífero expresa anticuerpos solo de cadena pesada que carecen de un dominio CH1 en el ARNm de cadena pesada transcrito y procesado, y en el que los anticuerpos solo de cadena pesada se expresan de un locus transgénico en el mamífero;
- (b) aislar células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria del mamífero inmunizado;
- (c) aislar una población de ARNm de células derivadas de la etapa (b);
- (d) clonar una población de ADNc que comprende ADNc que codifican un dominio V_H derivado del ARNm de la etapa (c) en un vector de expresión de tal manera que un dominio V_H o una proteína de fusión V_H, que puede comprender una región efectora de cadena pesada, se exprese en la línea celular; y
- (e) seleccionar por lo menos una línea celular que produce un dominio V_H o una proteína de fusión V_H que se une específicamente al antígeno,

15

20

en el que el mamífero es un ratón o una rata.

25

Los presentes inventores han mostrado sorprendentemente que los anticuerpos solo de cadena pesada codificados por transgén también son expresados por células plasmáticas de vida larga murinas o linfocitos B de memoria, purificados de las glándulas linfáticas secundarias, médula ósea y bazo de animales transgénicos expuestos al antígeno que comprenden loci de gen solo de cadena pesada. Además, se han desarrollado métodos más altamente eficaces que anulan la necesidad de hibridomas o enfoques de presentación clásicos para la recuperación de anticuerpos específicos de antígeno solo de cadena pesada o dominios V_H solubles.

30

35

ADNc ventajosamente clonado que codifica anticuerpo solo de cadena pesada o dominios V_H solubles derivados de poblaciones de células plasmáticas o de células de memoria purificadas de animales transgénicos expuestos al antígeno pueden expresarse en cualquier línea celular de elección capaz de expresar, acumular, secretar o presentar una proteína de fusión de dominio V_H o anticuerpo solo de cadena pesada sobre la superficie celular. Las elecciones preferidas son líneas celulares microbianas o líneas celulares de mamífero adecuadas para la fabricación de material de grado químico.

40

Así, según la invención, los anticuerpos solo de cadena pesada y dominios V_H solubles se derivan de linfocitos B de memoria huésped o células plasmáticas de vida larga.

45

La línea celular de elección es preferentemente de origen de mamífero, pero puede derivarse de levadura o cualquier organismo capaz de acumular o secretar anticuerpos solo de cadena pesada y proteínas de fusión de dominio V_H, o presentar dichos anticuerpos solo de cadena pesada y proteínas de fusión de dominio V_H sobre la superficie celular.

50

El método es adecuado para el aislamiento de anticuerpos solo de cadena pesada, ya sean producidos naturalmente en el organismo huésped, tal como la llama, o como resultado de un locus transgénico expresado en un organismo huésped no humano.

55

Preferentemente, la línea de células de mamífero de elección es adecuada para la producción de material de calidad clínica, por ejemplo, células CHO.

60

El método es sencillo, altamente eficaz y muy adecuado para la automatización, ya que los anticuerpos solo de cadena pesada son homodímeros, no tetrámeros complejos. No hay necesidad de buscar la cadena ligera relacionada, un problema que se ha añadido mucho a la complejidad de derivar anticuerpos tetraméricos específicos de antígeno de poblaciones de células de memoria y de células plasmáticas (véase Meijer et al. (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, 525, 261-277).

65

Las poblaciones de linfocitos B enriquecidas en células plasmáticas de vida larga o células de memoria pueden aislarse del organismo huésped por varias técnicas bien establecidas en la técnica. El organismo huésped preferido es un ratón. En el ratón, las poblaciones de linfocitos B están bien caracterizadas y pueden usarse marcadores de superficie celular para diferenciar entre diferentes sub-poblaciones. Por ejemplo, células plasmáticas de ratón que expresan CD138 (sindecano-1) sobre la superficie celular. La expresión de CD138 sobre células del linaje de linfocitos B se correlaciona con la etapa de desarrollo, localización y adhesión (véanse Sanderson et al. (1989) *Cell Regulation*, 1, 27-35; Kim et al (1994) *Mol. Biol. Cell.*, 5, 797-805). Las células plasmáticas CD 138⁺ se encuentran predominantemente en el bazo, nodos linfáticos y médula ósea. Las células plasmáticas pueden distinguirse además

de los linfocitos B intactos murinos, linfocitos B de memoria y poblaciones de linfocitos no B en que son CD138+, CD45R (B220) bajo/negativo y CD19 bajo/negativo.

La disponibilidad de anticuerpos que reconocen marcadores de superficie celular permite la separación de células plasmáticas de otras poblaciones de linfocitos B por citometría activada por fluorescencia, o tecnologías de separación de células bien establecidas ampliamente disponibles en kits basados, por ejemplo, en procedimientos de separación magnética, en columna o por centrifuga usando anticuerpos conjugados a un sustrato sólido que permite la unión de una población de células de otra. Así, por ejemplo, perlas magnéticas que comprenden anti-CD45R (algunas veces conocidas como B220) eliminarán la mayoría de las células no plasmáticas de una población de linfocitos B mixtos. Una incubación posterior con perlas magnéticas que comprenden anti-CD138 capturarán una población de células plasmáticas altamente enriquecida (véase el kit de clasificación magnética para el aislamiento de células plasmáticas CD138+ de ratón de Miltenyi Biotec). También pueden usarse otros marcadores de superficie celular para aislar estas células (por ejemplo, Anderson et al. (2007) *J. Exp. Med.*, 204, 2103-14). Por tanto, la población de células de partida podría derivarse de nodos linfáticos y/o parches de Peyer.

Si no están disponibles mezclas de anticuerpos que se diferencian entre linajes de linfocitos B huésped dados, entonces una combinación de aislamiento de linfocitos B de médula ósea y nodos linfáticos, seguido por purificación de linfocitos B usando un anticuerpo contra un marcador de superficie de linfocitos pan-B, también proporcionará una población de células plasmáticas altamente enriquecida.

Esto es particularmente relevante para especies tales como vaca, conejo, oveja, etc., e incluso ser humano, en lo que los marcadores de superficie celular tales como CD138 pueden no estar disponibles. Los marcadores están disponibles para seleccionar poblaciones de linfocitos B particulares de otras especies (por ejemplo, http://www.miltenvibiotec.com/en/PG_91_625_CD138_Plasma_Cell_Isolation_Kit.aspx; Klein et al., Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B-cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells, (1998) *J. Exp. Med.*, 188, (9), 1679-89; Denham et al., Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells, (1998) *Vet Immunol Immunopathol.* 30;60(3-4):317-28; Boersma et al., Summary of workshop findings for porcine B-cell markers, (2001) *Vet. Immunol Immunopathol.*, 80, (1-2), 63-78; Naessens, Surface Ig on B lymphocytes from cattle and sheep, (1991) *Int. Immunol.*, 9, (3), 349-54; Sehgal et al., Distinct clonal Ig diversification patterns in young appendix compared to antigen-specific splenic clones, (2002) *J. Immunol.*, 168, (11), 5424-33).

Tras el aislamiento de ARNm de poblaciones de células plasmáticas o de memoria, el ADNc (que representa ya sea dominios HCAb o VH solos) se clona en el vector de expresión de elección, y el vector se transfecta en una población de células diana para la expresión de anticuerpos solo de cadena pesada o proteínas de fusión de VH. Las células que expresan anticuerpos solo de cadena pesada específicos de antígeno pueden seleccionarse, por ejemplo, por ELISA estándar en un formato de 96 pocillos, o en un formato de micromatriz o usando citometría activada por fluorescencia (FACS) para la derivación de líneas celulares.

Preferentemente, con el fin de aumentar al máximo la eficiencia del proceso, el vector de expresión se transfecta primero en bacterias y las colonias que contienen el ADNc clonado en el vector de expresión se recogen en un formato de 96 pocillos (u otro formato automatizable de alto rendimiento), se hacen crecer en el formato de 96 pocillos y el ADN se aísla en el mismo formato. El ADN de plásmido se transfecta posteriormente en el mismo formato en las células de expresión (por ejemplo, células HEK o levadura, etc.) y los transformantes se hacen crecer en el mismo formato de 96 pocillos. El sobrenadante de las células se prueba posteriormente en el mismo formato (u otro, preferentemente formato de densidad más alta, tal como un micromatriz, usando menos antígeno) para unión a antígeno. Las células que expresan HCAb positivas para antígeno pueden luego expandirse adicionalmente y los ADNc positivos están inmediatamente disponibles del formato de 96 pocillos original en el que el ADN se preparó para caracterización posterior, tal como análisis de secuencia, o el dominio VH relevante puede clonarse inmediatamente en un esqueleto diferente, por ejemplo, una región constante diferente de la misma especie o una especie diferente. El ADN también puede transfectarse inmediatamente en otros tipos de células para establecer otras líneas celulares.

Las líneas celulares que expresan anticuerpos de alta afinidad pueden entonces expandirse, establecerse bancos de células y usarse como una fuente de anticuerpos solo de cadena pesada diana para fines de investigación o estudios clínicos o potencialmente pre-clínicos. Así, el método incluye además la etapa de mantener una línea celular seleccionada que produce un anticuerpo solo de cadena pesada o proteína de fusión de VH que se une específicamente al antígeno diana.

Este método de clonación directa también sería ventajoso para anticuerpos tetraméricos derivados de transgén normales en los que se usan células CD138⁺ individuales por pocillo. El ARNm (abundante) que codifica las cadenas pesada y ligera se amplificaría por PCR usando por separado cebadores específicos de cadena y cada uno se clonaría luego en el vector de expresión. La co-transfección de los dos produciría la expresión de un anticuerpo tetramérico que podría identificarse de la misma manera que se describe para el anticuerpo solo de cadena pesada.

Los vectores de expresión de elección serán conocidos por el experto en la técnica y se diseñarán para impulsar

anticuerpos solo de cadena pesada eficaces o la expresión de proteína de fusión de VH en el tipo de célula de elección. Si se contempla secreción, el vector incorporará un péptido señal en el extremo amino. Si se contempla expresión de la superficie celular, también habrá una secuencia de péptido hidrófobo en el extremo carboxilo. Preferentemente, pero no esencialmente, tales péptidos de amino y carboxilo pueden derivarse de inmunoglobulinas de cadena pesada de mamífero. Los vectores se diseñaran en formato de casete de tal manera que los dominios VH solubles clonados a partir de anticuerpos solo de cadena pesada específicos de antígeno puedan producirse como proteínas de fusión. La proteína de fusión resultante puede ser un anticuerpo solo de cadena pesada y comprenderá un dominio VH soluble y el dominio efector de cadena pesada de elección. Si el dominio VH soluble y el dominio efector elegido son de origen humano, entonces la proteína de fusión resultante será un anticuerpo solo de cadena pesada humano de la clase (y sub-tipo) especificado por la elección de la región efectora (por ejemplo, IgM, IgG, IgA, IgE o IgD). El cualquier anticuerpo solo de cadena pesada, el dominio VH soluble y las regiones efectoras constantes estarán enlazados por una región bisagra. Preferentemente, pero no esencialmente, ésta será una región bisagra de inmunoglobulina de cadena pesada natural derivada de la clase o subtipo apropiado.

La ventaja del método anterior sobre otros métodos tales como la presentación en fagos o hibridomas usando materiales derivados de bazo total, es que el método selecciona los anticuerpos solo de cadena pesada de alta afinidad (10 nmoles o mejor) producidos en células plasmáticas o de memoria siguiendo procedimientos de selección *in vivo* todavía desconocidos. Tales poblaciones de linfocitos B dan anticuerpos solo de cadena pesada (HCABs) que son solubles y no se acumulan en compartimientos intracelulares (tal acumulación conduciría de otra manera a apoptosis). Dichos HCAB pueden expresarse eficazmente usando sistemas de expresión estándar, en particular en líneas de células de mamífero establecidas tales como HEK o CHO. Las células transfectadas pueden entonces presentarse usando tecnología establecida, normalmente formato de micropocillo automatizable (por ejemplo, 96 pocillos). Aquellas células que expresan ligantes de antígeno de HCAB de alta afinidad, o alternativamente células que expresan HCABs que se unen a antígeno en un intervalo definido de afinidades, pueden entonces seleccionarse para análisis posterior. Alternativamente, los ligantes de alta afinidad pueden seleccionarse por análisis de FACS. El uso de células de memoria o células plasmáticas derivadas de uno o más animales no humanos transgénicos expuestos al antígeno, por ejemplo, un ratón, que expresan HCABs específicos de antígeno como una fuente de ARNm de HCAB proporciona una vía extraordinariamente eficiente para selección de HCAB, permitiendo la selección de potencialmente millones de células productoras de HCAB para el posterior análisis. Las células seleccionadas que expresan ligantes de antígeno de HCAB de alta afinidad pueden entonces expandirse en cultivo, proporcionando una fuente de células productoras de HCAB en ausencia de etapas de clonación adicionales.

Opcionalmente, las células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria aislados pueden immortalizarse antes del aislamiento y clonación de ARNm de anticuerpos solo de cadena pesada específicos de antígeno o dominios VH.

En el presente documento también se desvela un mamífero no humano transgénico que tienen un locus de cadena pesada transgénico o locus solo de cadena pesada (que carece de funcionalidad CH1) que incluye un gen marcador selectivo dominante. También se contempla la inclusión de más de un marcador selectivo, estando cada marcador enlazado a un locus diferente o grupo de loci, permitiendo la selección preferencial de hibridomas que expresan uno en oposición a otro locus o grupo de loci capaces de expresar anticuerpos solo de cadena pesada.

El uso de múltiples marcadores selectivos sobre diferentes loci se basa en el descubrimiento de que, si un mamífero no humano transgénico posee múltiples loci solo de cadena pesada, estos loci están expuestos a exclusión alélica (documento PCT/IB2007/001491). Por lo tanto, tras la exposición a antígeno, solo un locus es elegido estocásticamente y recombinado satisfactoriamente, produciendo la producción de un anticuerpo solo de cadena pesada. Por lo tanto, pueden usarse múltiples loci solo de cadena pesada de VH en el mismo mamífero no humano transgénico para aumentar al máximo el repertorio y la diversidad de anticuerpos obtenibles del mamífero. Cuando se expone al antígeno, el mamífero no humano transgénico llevará a cabo recombinaciones aleatorias en un locus después de otro, sin preferir ningún locus dado, hasta que una de las recombinaciones sea "productiva", es decir, que produzca la generación de un anticuerpo. La recombinación adicional se detiene, "excluyendo" así otros alelos (loci). Se expandirán preferencialmente las células que produzcan anticuerpo de alta afinidad.

Normalmente, los genes marcadores selectivos dominantes serán de origen procariota y se seleccionarán de un grupo que o bien confiere resistencia a fármacos tóxicos, tales como puromicina, higromicina y G418, o bien comprende genes que obvian ciertos requisitos nutricionales de tal manera que su expresión convierta una sustancia tóxica en un aminoácido esencial, por ejemplo, la conversión de indol a triptófano o la conversión de histidinol a histidina. Un requisito necesario es que, si se usa un marcador selectivo, se co-exprese con el alelo de inmunoglobulina solo de cadena pesada, asegurando así la expresión de linfocitos B y la expresión independiente del sitio de integración de un locus transgénico. Alternativamente, el gen de resistencia a fármacos puede insertarse en un locus de inmunoglobulina endógeno o exógeno (transgénico) usando recombinación homóloga en combinación con células ES o enfoques de transferencia nuclear.

Por consiguiente, se proporciona un método para la producción de un anticuerpo monoclonal que requiere la selección de un hibridoma o línea de linfocitos B transformada preferentemente derivada de células de memoria o plasmáticas que expresan un locus solo de cadena pesada de inmunoglobulina definido, que comprende uno de

múltiples loci de gen solo de cadena pesada presentes en el mamífero transgénico no humano, comprendiendo dicho locus un gen marcador selectivo dominante co-expresado insertado dentro de dicho locus.

5 Preferentemente, el locus es un locus solo de cadena pesada que comprende un gen marcador selectivo dominante, locus que expresa un anticuerpo solo de cadena pesada. Preferentemente, el anticuerpo solo de cadena pesada se produce a partir de un locus solo de cadena pesada endógeno manipulado por ingeniería para carecer de funcionalidad CH1, o un transgén de cadena pesada introducido que carece de funcionalidad CH1, opcionalmente en ausencia de expresión de gen de cadena ligera de inmunoglobulina. Dicho locus también puede comprender un
10 marcador selectivo dominante y un locus de cadena pesada en ausencia de los loci de cadena ligera, dando lugar dicho gen de cadena pesada espontáneamente, cuando se expresa, a un transcrito de ARNm que carece de funcionalidad CH1, produciendo la expresión de anticuerpo solo de cadena pesada de una manera dependiente de linfocitos B.

15 Según el tercer aspecto de la invención, si se contemplan enfoques de transformación de hibridoma o de linfocitos B para la inmortalización de células plasmáticas o de memoria, entonces la inclusión de un gen marcador selectivo dominante funcional en cada locus de cadena pesada permite la posterior selección y el mantenimiento estable de hibridoma o líneas de linfocitos B transformadas que expresan un locus de interés tras la exposición a antígeno, mientras pierden todas las células de hibridoma o linfocitos B transformados que no expresan ese locus de interés. Para el fin de la invención, puede usarse cualquier gen marcador selectivo dominante, siempre que la expresión del
20 gen confiera un beneficio selectivo a hibridomas en presencia de una exposición selectiva, por ejemplo, tóxica (véase Vara et al. (1986) NAR, 14, 4617-4624; Santerre et al. (1984) Gene, 30, 147-156; Colbere-Garapin et al. (1981) 150, 1-14; Hartmann and Mulligan (1988) PNAS, 85, 8047-8051).

El locus solo de cadena pesada heterólogo

25 En el contexto de la presente invención, el término "heterólogo" significa una secuencia de nucleótidos o un locus como se describe en el presente documento no endógeno al mamífero en el cual está localizado o un locus endógeno que ha sido modificado por la sustitución o eliminación de secuencias endógenas.

30 Un "locus solo de cadena pesada", en el contexto de la presente invención, se refiere a un locus que codifica un dominio VH que comprende uno o más segmentos de gen V, uno o más segmentos de gen D y uno o más segmentos de gen J, operacionalmente enlazados a una o más regiones efectoras de cadena pesada (careciendo cada una de funcionalidad de dominio CH1).

35 La complejidad del segmento de gen V puede aumentarse aumentando el número de segmentos de gen V presentes en el locus o usando diferentes loci, comprendiendo cada uno diferentes segmentos de gen V.

Preferentemente, el locus solo de cadena pesada comprende de cinco a veinte segmentos de gen V diferentes, derivados de cualquier especie de vertebrado.

40 Preferentemente, los segmentos de gen V son de origen humano, opcionalmente seleccionados o manipulados por ingeniería para solubilidad mejorada.

45 Preferentemente, el locus solo de cadena pesada comprende de dos a cuarenta (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30 o 40) o más segmentos de gen D. Los segmentos de gen D pueden derivarse de cualquier especie de vertebrado pero, lo más preferentemente, los segmentos de gen D son segmentos de gen D humanos (normalmente 25 segmentos de gen D).

50 Preferentemente, el locus solo de cadena pesada comprende de dos a veinte (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20) o más segmentos de gen J. El segmento de gen J puede derivarse de cualquier especie de vertebrado pero, lo más preferentemente, los segmentos de gen J son segmentos de gen J humanos (normalmente 6 segmentos de gen J).

55 Preferentemente, el locus solo de cadena pesada comprende dos o más segmentos de gen V, veinticinco segmentos de gen D humanos funcionales y seis segmentos de gen J humanos.

60 El término "segmento de gen V" engloba un segmento de gen V que existe de forma natural derivado de un vertebrado, incluyendo camélidos y humano, que opcionalmente han sido seleccionados, mutados o manipulados por ingeniería para características mejoradas, tales como solubilidad. Los segmentos de gen V también se encuentran en otras especies de vertebrados tales como tiburón (véase Kokubu et al. (1988) EMBO J., 7, 3413-3422) o han evolucionado para proporcionar diversas familias similares a VH de proteínas de unión ejemplificadas, por ejemplo, en la evolución del repertorio de VL de cadena ligera de anticuerpo o el repertorio de VH de receptor de linfocitos T.

65 El segmento de gen V debe ser capaz de recombinarse con un segmento de gen D, un segmento de gen J y una región constante (efectora) de cadena pesada (que puede comprender varios exones pero excluye un exón CH1)

según la presente invención para generar un anticuerpo solo de cadena pesada cuando el ácido nucleico se expresa.

Un segmento de gen V según la presente invención también incluye dentro de su alcance cualquier secuencia de gen que codifica un homólogo, derivado o fragmento de proteína que es capaz de recombinarse con un segmento de gen D, un segmento de gen J y una región efectora constante de cadena pesada (que comprende uno o más exones pero no un exón CH1 funcional) según la presente invención para generar un anticuerpo solo de cadena pesada como se define en el presente documento. La región efectora constante de cadena pesada puede comprender un dominio CH1 bajo circunstancias en las que un *locus* de cadena pesada de inmunoglobulina se expresa en un contexto de animal huésped desprovisto de expresión de gen de cadena ligera de inmunoglobulina.

Así, las secuencias codificantes de VH pueden derivarse de una fuente que existe de forma natural o pueden manipularse por ingeniería o sintetizarse usando métodos familiares para los expertos en la técnica.

Un "dominio VH soluble" en el contexto de la presente invención se refiere a un producto de expresión de un segmento de gen V cuando se recombina con un segmento de gen D y un segmento de gen J como se definió anteriormente. Tras la selección natural y la maduración de afinidad del HCAb progenitor, el dominio VH soluble como se usa en el presente documento tras la expresión y aislamiento permanece en disolución en ausencia de agregación y es activo en un medio fisiológico sin la necesidad de ningún otro factor para mantener la solubilidad. El dominio VH soluble solo también puede manipularse por ingeniería con diversos dominios de proteína para producir proteínas de fusión para fines terapéuticos y de diagnóstico dirigidos, por ejemplo, con toxinas, enzimas y agentes formadores de imagen, o con proteínas de la sangre tales como albúmina para manipular la farmacocinética de dominio VH soluble y la distribución en tejido *in vivo* (véanse el documento US 5.843.440 y Smith et al. (2001) Bioconjugate Chem., 12, 750-756).

En el contexto de la presente invención, los términos 'un segmento de gen D' y 'un segmento de gen J' incluyen secuencias que existen de forma natural de segmentos de gen D y J. Preferentemente, los segmentos de gen D y J se derivan del mismo vertebrado del cual se derivó el segmento de gen V. Por ejemplo, si un segmento de gen V se deriva de un ser humano y después se solubiliza o manipular por ingeniería, los segmentos de gen D y J también se derivan preferentemente de un ser humano. Alternativamente, los segmentos de gen V pueden derivarse, por ejemplo, de rata o ratón y los segmentos de gen D y J de camello o ser humano.

Los términos segmentos de gen D y segmentos de gen J también incluyen dentro de su alcance derivados, homólogos y fragmentos de los mismos, siempre que el segmento resultante pueda recombinarse con los componentes restantes de un locus de anticuerpo de cadena pesada como se describe en el presente documento para generar un anticuerpo solo de cadena pesada como se describe en el presente documento. Los segmentos de gen D y J pueden derivarse de fuentes que existen de forma natural o pueden sintetizarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en el presente documento. Los segmentos de gen D y J pueden incorporar residuos de aminoácidos adicionales definidos o sustituciones o deleciones de aminoácidos definidos en vista a aumentar la diversidad de CDR3.

Los segmentos de gen V, D y J son capaces de recombinarse y preferentemente experimentar mutación somática.

Los segmentos de gen V, D y J se derivan preferentemente de una sola especie de vertebrado. Ésta puede ser cualquier especie de vertebrado, pero es preferentemente un ser humano.

Las secuencias distintivas son cuatro sustituciones de secuencia de aminoácidos codificadas por línea germinal definida (tétrada de VHH) presentes en dominios VHH de camélido, pero no en dominios VH solubles. Todas estas están presentes en la segunda región estructural y funcionan para reducir el carácter hidrófobo de la interfase de cadena ligera anterior. Glu-44 y Arg-45 se encuentran en lugar de Gly-44 y Leu-45 menos hidrófilos presentes en dominios VH, mientras que el carácter hidrófilo en la posición 47 aumenta por la sustitución de Trp con residuos más pequeños. El cuarto cambio requiere la sustitución de Val-37 por Phe o Tyr.

La región constante de cadena pesada

Operacionalmente, una región constante de cadena pesada está codificada por un segmento de gen que existe de forma natural o manipulado por ingeniería que es capaz de recombinarse con un segmento de gen V, un segmento de gen D y un segmento de gen J en un linfocito B. Preferentemente, la región constante de cadena pesada se deriva de un locus de anticuerpo.

Cada región constante de cadena pesada comprende esencialmente por lo menos un gen de región constante de cadena pesada, que se expresa sin un dominio CH1 funcional, de modo que puede ocurrir la generación de anticuerpo solo de cadena pesada. En ausencia de expresión de gen de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno, entonces la región constante de cadena pesada puede comprender funcionalidad CH1 que puede deleccionarse espontáneamente a baja frecuencia durante la expresión de gen de cadena pesada. Cada región constante de cadena pesada también puede comprender uno o más exones de región constante de cadena pesada

adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en C δ , C γ 1-4, C μ , C ϵ y C α 1-2. Los segmentos de gen de región constante de cadena pesada se seleccionan dependiendo de la clase preferida o mezcla de clases de anticuerpo requeridas. Opcionalmente, el locus de cadena pesada heterólogo es deficiente en C μ y C δ .

5 Por ejemplo, la expresión de todo o una parte de un locus C γ de cadena pesada heterólogo desprovisto de CH1 producirá opcionalmente algunos o todos los isotipos de IgG, dependientes de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 presentes en el locus de IgG heterólogo.

10 Alternativamente, pueden obtenerse mezclas seleccionadas de anticuerpos. Por ejemplo, pueden obtener IgA e IgM cuando la región constante de cadena pesada comprende un gen C α y un gen C μ .

15 La región constante de cadena pesada presente en el locus transgénico puede ser de origen humano, pero puede ser el mismo que o estrechamente relacionado con el del mamífero huésped para aumentar al máximo las respuestas a antígeno *in vivo*. Así, para la derivación de anticuerpos solo de cadena pesada o dominios VH solubles que van a usarse para aplicaciones terapéuticas en seres humanos, los genes VDJ presentes en el locus se derivarán de las secuencias de línea germinal humanas, opcionalmente modificadas, y las regiones constantes pueden ser de origen de roedor si el animal huésped es un roedor, por ejemplo, un ratón. Los anticuerpos solo de cadena pesada seleccionados que comprenden dominios de unión VH humanos solubles y regiones efectoras constantes de roedor pueden entonces clonarse, y reemplazarse las regiones efectoras de roedor por regiones efectoras constantes humanas de elección, o el dominio VH soluble usado para derivar proteínas de fusión de VH alternativas, complejos de anticuerpo de dominio VH y similares.

25 Si los anticuerpos solo de cadena pesada van a usarse para fines veterinarios o alternativos, los segmentos de gen V, D y J de derivan preferentemente del vertebrado o mamífero mejor adecuado para el fin previsto. Por ejemplo, segmentos de gen V y segmentos de gen D y J pueden derivarse de otros mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, cerdo, vaca, cabra, oveja, camello, etc.) dependiendo del uso previsto, por ejemplo, aplicaciones veterinarias, industriales, agrícolas, de diagnóstico o reactivo.

30 Un 'exón constante de cadena pesada' ('exón CH'), como se define en el presente documento, incluye las secuencias de exones CH de vertebrado que existen de forma natural, pero especialmente de mamífero. Esto varía de una manera específica de clase. Por ejemplo, IgG e IgA están desprovistos naturalmente de un dominio CH4. El término 'exón CH' también incluye dentro de su alcance derivados, homólogos y fragmentos del mismo, siempre que el exón CH sea capaz de formar un anticuerpo solo de cadena pesada funcional como se define en el presente documento cuando es un componente de una región constante de cadena pesada.

35 **Mamíferos**

El mamífero transgénico usado en los métodos de la invención no es un humano. El mamífero transgénico es un ratón o una rata.

40 Preferentemente, los animales transgénicos que comprenden loci de anticuerpo solo de cadena pesada heterólogos integrados en la línea germinal se generan usando tecnología de inyección de ovocitos establecida y, si está establecida, tecnologías de células ES, tecnología de células iPS o tecnología de transferencia nuclear (clonación). Alternativamente, los loci pueden introducirse en las células anteriores o directamente en óvulos fecundados usando nucleasas de dedo de zinc (Remy et al. (2009) *Transgenic Res.*, 2009 Sep 26. [Publicado electrónicamente antes de ser impreso], Kandavelou et al. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, ;388, (1), 56-61) o tecnología de enzima de recombinación (por ejemplo, Sakurai et al. (2010) *Nucleic Acids Res.*, Jan 13 [Publicado electrónicamente antes de ser impreso] y referencias en el mismo) tales como cre, etc.

50 La recombinación homologa estándar en células ES también puede usarse para eliminar funcionalidad CH1 de genes de cadena pesada endógenos y para reemplazar elementos o secuencias dentro de segmentos de genes V endógenos o segmentos de gen D y J, dando por resultado la producción de anticuerpos solo de cadena pesada de los loci de cadena pesada endógenos.

55 Ventajosamente, la expresión de transgén de loci de gen solo de cadena pesada se potencia, si los loci de cadena pesada de anticuerpo endógenos al mamífero se delecionan o silencian o tienen una capacidad reducida para producir anticuerpos endógenos. Si los loci de cadena pesada de huéspedes endógenos han sido manipulados por ingeniería para eliminar funcionalidad CH1, y VDJ y opcionalmente las regiones efectoras constantes reemplazadas por secuencia de otras especies, preferentemente humanas, entonces la adición de ciertos loci de cadena pesada transgénicos adicionales es necesaria.

60 Este enfoque de generar anticuerpos solo de cadena pesada y dominios VH solubles como se describió antes puede ser de uso particular en la generación de anticuerpos solubles y complejos de anticuerpo libres de agregados para uso terapéutico humano. Por lo tanto, en el presente documento también se desvela un mamífero transgénico que expresa un locus de cadena pesada heterólogo como se desvela en la presente invención en respuesta a exposición a antígeno.

Las células productoras de anticuerpo pueden derivarse de animales transgénicos según la presente invención y usarse para la recuperación de células de memoria o células plasmáticas de vida larga, incluyendo para la producción de anticuerpos solo de cadena pesada de hibridomas o por enfoques de matriz como se definen en el presente documento. Además o alternativamente, las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos solo de cadena pesada y/o dominios VH solubles pueden aislarse de células de memoria o células plasmáticas de vida larga, de mamíferos transgénicos según la presente invención tras la exposición a antígeno y usarse para producir anticuerpos solo de cadena pesada de dominio VH soluble, complejos de dominio VH bi-específicos/bi-funcionales solubles, o poliproteínas de dominio VH solubles (véase el documento WO 99/23221), usando técnicas de ADN recombinante que son conocidas por los expertos en la técnica.

Alternativamente o además, anticuerpos solo de cadena pesada específicos de antígeno policlonales pueden generarse por inmunización de un animal transgénico según la presente invención.

Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la producción de anticuerpos solo de cadena pesada de alta afinidad inmunizando un mamífero transgénico con un antígeno, en el que el mamífero es un ratón o una rata.

Producción de anticuerpos solo de cadena pesada y proteínas de fusión de dominio VH soluble

Los sistemas de producción de anticuerpos solo de cadena pesada y proteínas de fusión de dominio VH solubles incluyen células de mamífero en cultivo (por ejemplo, células CHO), plantas (por ejemplo, maíz), cabras, conejos, ganado vacuno, ovejas, pollos y larvas de insecto transgénicos adecuados para tecnología de crianza masiva. Otros sistemas de producción, incluyendo infección por virus (por ejemplo, baculovirus en larvas de insectos y líneas celulares) son alternativas al cultivo de células y enfoques de línea germinal. Otros métodos de producción también serán conocidos por los expertos en la técnica. Si hay un requisito de ensamblaje de IgA o IgM solo de cadena pesada, la co-expresión de una "cadena J" puede ser beneficiosa. Métodos adecuados para la producción de anticuerpos solo de cadena pesada o dominios de unión VH solubles solos, o complejos de dominio de unión VH, son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los dominios de unión VH y complejos de dominio de unión VH se han producido en sistemas bacterianos y homodímeros solo de cadena pesada han sido producidos en hibridomas y células de mamífero transfectadas (véase Reichmann y Muyltermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38).

Los métodos también están bien establecidos para la expresión de dominios de unión VH humanos manipulados por ingeniería derivados de usar tecnología de presentación en fagos (Tanha et al. (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24789 y referencias en el mismo).

En el presente documento también se desvela una secuencia de polinucleótidos que consiste en el locus de cadena pesada heterólogo, un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo solo de cadena pesada como se desvela en el presente documento y un vector que comprende un locus de cadena pesada heterólogo, o fragmento del mismo, o polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo solo de cadena pesada como se desvela en el presente documento. También se desvelan en el presente documento secuencias de polinucleótidos que codifican dominios VH solubles y proteínas de fusión de dominio VH y un vector que comprende tales secuencias.

En el presente documento también se desvela una célula huésped transformada con un locus solo de cadena pesada heterólogo, o fragmento del mismo, o polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo solo de cadena pesada, dominio VH soluble o proteína de fusión de dominio VH según la presente invención.

Usos de los anticuerpos solo de cadena pesada, dominios VH solubles y complejos de polipéptido de dominio VH y poliproteínas de la invención

Los anticuerpos solo de cadena pesada de alta afinidad, proteínas de fusión de dominio VH, complejos de polipéptido de dominios VH y dominios VH solubles de la presente invención son particularmente adecuados para usarse tanto como medicinas parenterales como no parenterales. Dentro del contexto de la invención, preferentemente éstos son completamente de origen humano, pero opcionalmente y menos preferentemente pueden comprender segmentos de gen V, D o J de otras especies.

La solubilidad potenciada de anticuerpos solo de cadena pesada que comprenden dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados y complejos de unión de dominio VH soluble y poliproteínas de la invención son especialmente adecuados para usarse como reactivos y diagnósticos además de terapia.

Todos son adecuados para uso farmacéutico en seres humanos y así en el presente documento se desvela una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados, complejos de unión de dominio VH soluble o poliproteínas de dominio VH soluble. En el presente documento también se desvela el uso de un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados, complejos de unión de dominio VH soluble o poliproteínas de dominio VH soluble en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas y medicamentos se formularán normalmente antes de la administración a los pacientes.

5 Por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados, complejos de unión de dominio VH soluble o poliproteínas de dominio VH soluble puede mezclarse con estabilizadores, particularmente si van a liofilizarse. La adición de azúcares (por ejemplo, manitol, sacarosa o trehalosa) es típica para dar estabilidad durante liofilización, y un estabilizador preferido es manitol. También puede añadirse albúmina de suero humano (preferentemente recombinante) como estabilizador. También pueden usarse mezclas de azúcares, por ejemplo, sacarosa y manitol, trehalosa y manitol, etc.

10 También puede añadirse tampón a la composición, por ejemplo, un tampón Tris, un tampón de histidina, un tampón de glicina o preferentemente un tampón de fosfato (por ejemplo, que contiene dihidrogenofosfato de sodio y dihidrogenofosfato de disodio). Se prefiere la adición de tampón para dar un pH entre 7,2 y 7,8, y en particular un pH de aproximadamente 7,5.

15 Para reconstitución después de la liofilización, puede usarse agua estéril para inyección. También es posible reconstituir una torta liofilizada con una composición acuosa que comprende albúmina de suero humano (preferentemente recombinante).

20 Generalmente, el anticuerpo solo de cadena pesada que comprende dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados, complejos de unión de dominio VH soluble o poliproteínas de dominio VH soluble se utilizarán en forma purificada junto con vehiculos farmacológicamente apropiados.

25 En el presente documento también se desvela un método de tratamiento de un paciente, que comprende administrar una composición farmacéutica desvelada en el presente documento al paciente. El paciente es preferentemente un ser humano, y puede ser un niño (por ejemplo, un bebé mayor o un bebé), un adolescente o un adulto, pero generalmente será un adulto.

30 En el presente documento también se desvela un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados, complejos de unión de dominio VH soluble y poliproteínas de dominio VH solubles desvelados en el presente documento para uso como un medicamento.

35 En el presente documento también se desvela el uso de anticuerpos solo de cadena pesada que comprenden dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados, complejos de unión de dominio VH soluble y poliproteínas de dominio VH soluble desvelados en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente.

40 Esos usos, métodos y medicamentos son preferentemente para el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen, pero no se limitan a: cicatrización de heridas, trastornos proliferativos de células, incluyendo neoplasma, melanoma, tumores de pulmón, colorrectal, osteosarcoma, rectal, de ovario, sarcoma, cervical, esofágico, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello y otros tumores sólidos; trastornos mieloproliferativos tales como leucemia, linfoma no Hodgkin, leucopenia, trombocitopenia, trastorno de la angiogénesis, sarcoma de Kaposi; trastornos autoinmunes/inflamatorios, incluyendo alergia, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis, psoriasis e inflamación de las vías respiratorias, asma, inmunotrasornos y rechazo de trasplante de órganos; trastornos cardiovasculares y vasculares, incluyendo hipertensión, edema, angina, aterosclerosis, trombosis, septicemia, choque, lesión por reperfusión e isquemia; trastornos neurológicos incluyendo enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral, esclerosis lateral amiotrófica y dolor; trastornos del desarrollo; trastornos metabólicos incluyendo diabetes mellitus, osteoporosis y obesidad, SIDA y enfermedad renal; infecciones incluyendo infección viral, infección bacteriana, infección fúngica e infección parasítica, afecciones patológicas asociadas a la placenta y otras afecciones patológicas y para uso en inmunoterapia.

50 En el presente documento también se desvela el uso de un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados, complejos de unión de dominio VH soluble o poliproteínas de dominio VH soluble desvelados en el presente documento como agente de formación de imagen de diagnóstico, pronóstico o terapéutico solo o en combinación con agentes efectores adecuados.

55 En el presente documento también se desvela el uso de un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende dominios VH solubles, dominios VH solubles aislados, complejos de unión de dominio VH soluble o poliproteínas de dominio VH soluble como se describen en el presente documento como un reactivo de unión intracelular, o una abzima. Se prefieren dominios de unión a VH soluble, complejos de unión de dominio VH soluble y poliproteínas de dominio VH soluble específicos de antígeno.

60 En el presente documento también se desvela el uso de un anticuerpo solo de cadena pesada específico de antígeno o dominio de unión VH soluble desvelados en el presente documento como un inhibidor de enzima o bloqueador de receptor. Los fragmentos de anticuerpo solo de cadena pesada preferidos son dominios de unión de VH soluble específicos de antígenos.

65

En el presente documento también se desvela el uso de uno o más dominios VH solubles fusionados a una molécula efectora para uso como un agente terapéutico, agente formador de imagen, agente de diagnóstico, abzima o reactivo.

- 5 La invención se describe ahora, a modo de ejemplo únicamente, en la siguiente descripción detallada que se refiere a las siguientes figuras.

Figuras

10 **Figura 1.** Dos loci de inmunoglobulina solo de cadena pesada humanos, portando uno cuatro segmentos de gen VH, portando el otro 18 segmentos de gen VH. Los loci que comprenden 18 segmentos de gen VH comprenden regiones efectoras constantes de ratón (-CH1) cubren más del 90 % del uso de segmento de gen VH en anticuerpos tetravalentes humanos normales.

15 **Figura 2.** Protocolo de inmunización y de aislamiento para dominio VH humano por presentación en fagos o anticuerpos solo de cadena pesada humanos por tecnología de hibridoma estándar.

20 **Figura 3.** ELISA (superior) y transferencia Western (inferior) del suero inmunizado por Luk-sPV (V4 comparado con ratones normales wt) y una transferencia Western de dominios VH individualmente aislados usando electroforesis en gel de la proteína Luk-soPV, transfiriéndola y detección con los diversos clones positivos del cribado de presentación en fagos.

25 **Figura 4.** Ejemplo de dos secuencias de dominio VH después de la inmunización con Luks-PV, que muestra que se producen tanto IgG2 como IgG3 (cambio de clase) y que el mismo reordenamiento de VDJ produce diferentes mutaciones.

30 **Figura 5.** Secuencias de dominio VH derivadas usando el segmento de gen V3-23 después de la inmunización con CR1 humano, que muestra que se producen tanto IgG2 como IgG3 (cambio de clase) y que el mismo reordenamiento de VDJ produce diferentes mutaciones, cuando se compara con la secuencia de línea germinal del segmento V3-23 mostrado en la parte superior. Se obtuvieron partes de la secuencia mediante hibridomas, el resto mediante bibliotecas de presentación.

35 **Figura 6.** Secuencias de dominio VH derivadas usando el segmento de gen V3-11 después de la inmunización con CR1 humano, mostrando que tanto IgG2 como IgG3 se producen (cambio de clase) y que el mismo reordenamiento de VDJ produce diferentes mutaciones, cuando se compara con la secuencia de línea germinal del segmento V3-11 mostrado en la parte superior. Se obtuvieron partes de las secuencias por hibridomas (flechas), y el resto por bibliotecas de presentación.

40 **Figura 7.** Ejemplo de electroforesis en gel (izquierda) de dominios VH (α CR1) después de la purificación y expresión en el sistema de proteína híbrido SUMO (Invitrogen). El ejemplo muestra tres dominios VH de longitud diferente del peso molecular correcto. El carril del marcador está a la izquierda. El panel medio muestra el perfil de elución de dominios VH en un sistema Sephadex 75 Smart. El panel de la derecha es el mismo, excepto por una IgG solo de cadena pesada completa en un Sephadex 200. El panel inferior muestra los perfiles de elución de otros dos dominios VH concentrados a > 4 mg/ml.

45 **Figura 8.** A. Gráfica de dispersión de la luz y B. Estabilidad térmica de dominios VH.

50 **Figura 9.** Mediciones de afinidad de un número de anticuerpo solo de cadena pesada α CR1 (izquierda) y los perfiles de unión y disociación de uno de los anticuerpos en un sistema Octet para obtener la afinidad de unión.

Figura 10. Solubilidad de varios dominios VH anti-CR1.

Figura 11. Secuenciación paralela masiva para determinar mutaciones preferidas.

55 **Figura 12.** Análisis de diagrama de caja de las regiones estructurales 1 (FR1) y CDR1 de anticuerpos solo de cadena pesada humanos (HCAb) en comparación con las mismas regiones de cadenas pesadas de camello, llama y humanas de anticuerpos de cadena pesada/ligera tetraméricos normales. La carga neta se determinó por la ecuación de Henderson-Hasselbach a pH = 7,4; el carácter hidrófobo neto se determinó por el índice de Cowan-Whittaker a pH = 7,5. Los números debajo de los diferentes anticuerpos son el número de secuencias de entrada únicas.

60 **Figura 13.** Análisis de diagrama de caja de las regiones estructurales 2 (FR2) y CDR2 de anticuerpos solo de cadena pesada humanos (HCAb) en comparación con las mismas regiones de cadenas pesadas de camello, llama y humanas de anticuerpos de cadena pesada/ligera tetraméricos normales. La carga neta se determinó por la ecuación de Henderson-Hasselbach a pH = 7,4; el carácter hidrófobo neto se determinó por el índice de Cowan-Whittaker a pH = 7,5. Los números debajo de los diferentes anticuerpos son el número de secuencias

65

de entrada únicas.

Figura 14. Análisis de diagrama de caja de las regiones estructurales 3 (FR3) y CDR3 de anticuerpos solo de cadena pesada humanos (HCAb) en comparación con las mismas regiones de cadenas pesadas de camello, llama y humanas de anticuerpos de cadena pesada/ligera tetraméricos normales. La carga neta se determinó por la ecuación de Henderson-Hasselbach a pH = 7,4; el carácter hidrófobo neto se determinó por el índice de Cowan-Whittaker a pH = 7,5. Los números debajo de los diferentes anticuerpos son el número de secuencias de entrada únicas.

Figura 15. Estructura tridimensional de dominios VH que se unen tanto a CR1 humano como a A Luk-sPV de Staph. El sitio de unión a antígeno está en la posición derecha superior y el dominio de interacción VL anterior está de frente al lector. Los cambios de aminoácidos están indicados por color en la estructura 3D.

Figura 16. Diferencias en el carácter hidrófobo promedio en cada posición del dominio VH (excepto CDR3) indicando un desplazamiento hacia carácter más hidrófobo en los anticuerpos solo de cadena pesada, en particular en el extremo N del dominio VH. Son evidentes varios puntos calientes en términos de diferencias del carácter hidrófobo en las posiciones 49, 62 y 72 en comparación con el VH tetramérico humano promedio.

Figura 17. Protocolo de inmunización y de aislamiento de HCAb humanos por distribución de células CD138 positivas y clonación de expresión directa en células HEK.

Figura 18. Vector para la expresión de células de mamífero de HCAb. El vector tiene un esqueleto de pUC estándar (no mostrado) con un gen de resistencia a ampicilina y un gen de resistencia a mamífero (higromicina). La parte relevante contiene un potenciador del CMV estándar y un promotor de β -actina de pollo (Invitrogen), seguido por un sitio de unión al ribosoma de Kozak seguido por la secuencia señal de VH3-23. El extremo posterior del casete consiste en tanto una región constante de IgG2 o IgG3 que empieza con la bisagra como en los dominios CH2. Los ADNc de VH se clonan entre estas dos regiones después de amplificación, con los iniciadores indicados por las flechas.

Figura 19. Ejemplo y resumen de la clonación de expresión directa de HCAb en células HEK. El panel superior a la izquierda muestra un ELISA estándar para determinar cuál de los ratones inmunizados respondió positivamente a la inmunización con antígeno HA (los ratones en rojo se usaron para la clonación de expresión de células HEK). El panel superior a la derecha muestra dos ejemplos de un ELISA llevada a cabo sobre las células HEK transfectadas en el formato de 96 pocillos.

Figura 20. Análisis de secuencia del HCAb positivo por ELISA derivado de la secuencia de línea germinal VH 3-11.

Figura 21. Análisis de secuencia de del HCAb positivo por ELISA derivado de la secuencia de línea germinal VH 3-23.

Figura 22. Perfil de elución de IgG solo de cadena pesada completas sobre columnas Sephadex 200 Smart.

Figura 23. Mediciones de afinidad de dos de los HCAb anti-HA sobre Octet.

Figura 24. Aminoácidos a través de las regiones VH del HCAb anti-HA en comparación con aquellos observados en HCAb humanos anti-CR1 (véase lo anterior), HCAb tetraméricos humanos y de llama.

Figura 25. Protocolo de inmunización y de aislamiento de HCAb humanos después de la distribución de células individuales y clonación de expresión directa en células HEK.

Figura 26. Protocolo de inmunización y de aislamiento de anticuerpos de cadena pesada y ligera humanos tetraméricos normales después de la distribución de células individuales y clonación de expresión directa en células HEK.

Ejemplo 1 Generación de anticuerpos anti-Luk-sFV

Se lleva a cabo inmunización con la proteína Luks-PV de Staph A en ratones transgénicos que contienen un locus de anticuerpo de cadena pesada completamente humano como se describe en el documento WO2006/008548. Estos ratones portan 4 segmentos VH humanos, todas de las regiones de cadena pesada D humanas, todas de las regiones JH humanas y las regiones C γ 2 y C γ 3 humanas (Figura 1).

Los dominios CH1 han sido delecionados de las regiones constantes C γ humanas para permitir la producción de anticuerpos solo de cadena pesada humanos como se ha descrito (Janssens et al (2006) PNAS, 103, 15130-15135). Los ratones se inmunizan usando protocolos estándar y los anticuerpos se aíslan como se muestra esquemáticamente en la Figura 2.

Los ratones se inmunizan cuatro veces por protocolos estándar y el suero se comprueba para una respuesta positiva por ELISA estándar (Figura 3).

5 Después de la inmunización, se recogen las células del bazo y el ARNm se transcribe de forma inversa y se amplifica en ADNc con cebadores específicos de dominio VH por métodos estándar (véase, por ejemplo, Janssens et al (2006) PNAS, 103, 15130-15135). Los fragmentos de VH resultantes se clonan en un vector de presentación en fagos. Después de 3 rondas de cribado e inmunopurificación por protocolos de presentación estándar, los dominios VH (VH-D-J) se clonan en un vector de expresión bacteriano. Los clones positivos se confirman por transferencia Western y el ADN clonado se secuencian posteriormente por métodos estándar, dando la definición de secuencia de aminoácidos de las regiones de dominio VH mostradas en la Figura 4.

15 Alternativamente, los anticuerpos pueden obtenerse por tecnología de hibridoma estándar. Los dominios VH obtenidos por tecnología de presentación en fagos pueden manipularse por ingeniería de regreso a una región efectora constante de cadena pesada de elección (desprovista de funcionalidad CH1) por métodos de clonación estándar para producir un anticuerpo solo de cadena pesada completo de elección en términos de la región constante (por ejemplo, C α en vez de C γ). De manera similar, los anticuerpos solo de cadena pesada obtenidos por tecnología de hibridoma pueden clonarse por tecnología de ADNc y PCR estándar. Esto permite el aislamiento de dominios VH solos.

20 Así, ambos enfoques pueden usarse para derivar dominios VH específicos de antígeno o anticuerpos solo de cadena pesada específicos de antígeno.

Ejemplo 2 Generación de anticuerpos humanos anti-CR1

25 El Ejemplo 2 es muy similar al Ejemplo 1, excepto que la inmunización se lleva a cabo con CR1 como el antígeno, una proteína que normalmente se expresa sobre la superficie de glóbulos rojos humanos. La inmunización también se llevó a cabo por inyección de glóbulos rojos murinos que expresan CR1 humano sobre su superficie celular. El resultado de las diferentes inmunizaciones es muy similar. La inmunización se lleva a cabo en ratones transgénicos que contienen un locus de anticuerpo de cadena pesada completamente humano como se describe en el documento WO 2006/008548. Estos ratones portan 4 segmentos VH humanos, todas de las regiones de cadena pesada D humana, todas de las regiones JH y las regiones C γ 2 y C γ 3 humanas (Figura 1).

35 Las regiones CH1 se han deletado de las regiones constantes C γ humanas para permitir la producción de anticuerpos solo de cadena pesada humanos como se ha descrito (Janssens et al (2006) PNAS, 103, 15130-15135). Los ratones se inmunizan usando protocolos estándar y los anticuerpos se aíslan como se muestra esquemáticamente en la Figura 2.

40 Después de la inmunización, se recogen las células del bazo y el ARNm se transcribe de forma inversa y se amplifica en ADNc con cebadores específicos de dominio VH por métodos estándar (por ejemplo, Janssens et al (2006) PNAS, 103, 15130-15135). Los fragmentos de VH resultantes se clonan en un vector de presentación en fagos. Después de 3 rondas de cribado e inmunopurificación por protocolos de presentación estándar, los dominios VH (VH-D-J) se clonan en un vector de expresión bacteriano. La secuencia clonada se secuencian posteriormente por métodos estándar, dando por resultado la región de dominio VH mostrada en las Figuras 5 y 6. Alternativamente, los anticuerpos pueden obtenerse por tecnología de hibridoma estándar (Figuras 5 y 6). Los dominios VH obtenidos por tecnología de presentación en fagos pueden manipularse por ingeniería de regreso a una región efectora constante de elección (desprovista de funcionalidad CH1) por métodos de clonación estándar para producir un anticuerpo completo solo de cadena pesada (por ejemplo, C α en vez de C γ). De manera similar, el anticuerpo solo de cadena pesada obtenido por tecnología de hibridoma puede clonarse por tecnología de ADNc y PCR estándar que permite el aislamiento de su dominio VH únicamente. Así, ambos enfoques pueden usarse para derivar dominios VH específicos de antígeno o anticuerpos solo de cadena pesada específicos de antígeno.

Ejemplo 3 Expresión de dominios VH y anticuerpos solo de cadena pesada, afinidad y solubilidad

55 Los dominios VH de los Ejemplos 1 y 2 pueden expresarse en un sistema de expresión bacteriano para obtener grandes cantidades de dominios VH purificados. Por ejemplo, el dominio VH puede expresarse como proteína híbrida en bacterias usando el sistema de expresión híbrido SUMO (Invitrogen). Cuando se purifican, éstos corren como un solo fragmento en geles de electroforesis en gel desnaturizantes (Figura 7). Cuando corren en un sistema de cromatografía Smart Sephadex bajo condición no desnaturizante, estos dominios VH corren predominantemente como un único pico principal del peso molecular correcto (Figura 7), con poca evidencia de agregados solubles.

60 El anticuerpo solo de cadena pesada derivado de sobrenadantes de hibridoma también corre predominantemente como un único pico principal, con evidencia de un pequeño porcentaje de dímero de anticuerpo en el borde delantero del pico.

65 El único pico de los dominios VH sugiere que son monómeros solubles, que se confirmó al ejecutar gráficas de

dispersión (Figura 8A), debido a que el pico de la dispersión de la luz coincide con el pico de absorción de proteína durante la ejecución. Finalmente, cuando se calientan, los dominios VH son estables hasta 55 °C como se mide por análisis de dicroísmo circular estándar (Figura 8B).

5 Finalmente, los dominios VH solubles y los HCAB se probaron para su afinidad de unión usando un sistema BiaCore y un sistema Octet. Las afinidades obtenidas estuvieron en el intervalo nanomolar bajo o mejor (Figura 9).

10 Varios dominios VH derivados de HCAB también se concentraron por centrifugación a vacío y la materia coloidal se eliminó por centrifugación a alta velocidad. Esto dio números de solubilidad que son una estimación mínima debido a que las pequeñas cantidades de muestra previnieron concentración adicional. Todos los dominios VH probados mostraron solubilidad en exceso de 4 mg/ml (Figura 10).

Ejemplo 4. Secuenciación masiva para determinar los patrones de mutación

15 A partir de una inspección de todas las secuencias recogidas de los anticuerpos que se unen a Luk-sPV, CR1 y otros antígenos, se hizo evidente que la recombinación de VDJ y maduración (hipermutación) de dominios VH humanos solubles derivados de transgenes de HCAB expresados en linfocitos B murinos fue muy diferente de aquella observada en dominios VHH de camello y llama, o dominios VH humanos derivados de anticuerpos de cadena pesada y ligera tetraméricos normales. Por lo tanto, se llevó a cabo una secuenciación paralela masiva (secuenciación de Roche 454) para seguir el proceso de recombinación a hipermutación. Ésta se usó para verificar que el proceso es de hecho diferente, y para entender qué parámetros y parte(s) del anticuerpo son importantes para la generación de un anticuerpo solo de cadena pesada humano soluble de alta afinidad tras la elección inicial de una recombinación de VDJ particular. Los resultados proporcionan una visión general de cómo tiene lugar el proceso (Figura 11).

25 Este análisis muestra que el ratón es capaz de introducir una gran variedad de sustituciones de aminoácidos a través del dominio VH del transgén expresado. El grueso está en la posición de CDR1 y CDR2. Sin embargo, también son evidentes sustituciones dentro de FR1 y FR2 y están distribuidas a través de FR3. Las regiones de interfase de CDR/FR aparecieron como puntos calientes para sustituciones. A partir de este análisis, está claro que el proceso de mutación, en términos de posiciones y las sustituciones de aminoácidos, es muy diferente del observado en dominios VHH de camélido y dominios VH presentes en anticuerpos humanos tetraméricos normales.

Ejemplo 5. Análisis comparativo de la región estructural y región CDR individuales presentes en los dominios VH solubles, dominios VHH y dominios VH derivados de anticuerpos tetraméricos

35 Se tabularon todas las mutaciones de los dominios VH solubles de unión a antígeno humanos y las diferentes regiones (FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3) se analizaron en comparación con los dominios VHH de anticuerpos solo de cadena pesada de camélido, anticuerpos solo de cadena pesada de llama y dominios VH humanos obtenidos de anticuerpos tetraméricos humanos normales.

40 Esta comparación comprendió 10 secuencias de dominio VHH de camello conocidas, 58 secuencias de dominio VHH de llama conocidas y más de 4000 secuencias de dominio VH humano conocidas derivadas de anticuerpos tetraméricos normales, todos obtenidos de la bibliografía y bases de datos de anticuerpos públicas.

45 La región FR1 de los dominios VH humanos solubles (Figura 12) muestra un aumento en la carga neta cuando se compara con camello y llama y un aumento en el carácter hidrófobo cuando se compara con dominios VH de camello, llama y derivados de anticuerpos tetraméricos humanos normales, mientras que el número de aminoácidos cargados ha aumentado.

50 La región CDR1 (Figura 12) tiene muy poco cambio en la carga neta (alguna disminución en comparación con llama) y un aumento en el carácter hidrófobo en relación con el dominio VH equivalente de anticuerpos tetraméricos humanos, dominios VHH de llama y camello. El número de aminoácidos cargados muestra poca diferencia significativa.

55 La región FR2 del dominio VH humano soluble (Figura 13) no muestra diferencia en la carga neta cuando se compara con dominios VHH de camello y llama y un aumento sustancial en el carácter hidrófobo cuando se compara con dominios VHH de camello y llama, mientras que el número de aminoácidos cargados ha disminuido en comparación con dominios VHH de camello y llama. En ambos aspectos, es similar a dominios VH humanos derivados de anticuerpos tetraméricos. La región CDR2 (Figura 13) tiene una carga neta similar a la de llama, que es mayor a la de anticuerpos tetraméricos de camello y humanos, y un carácter hidrófobo muy similar a los otros, mientras que el número de aminoácidos cargados es similar a los dominios VH humanos derivados de anticuerpos tetraméricos, pero un poco menor a los otros.

65 La región FR3 del dominio VH humano soluble (Figura 14) muestra un aumento en la carga neta cuando se compara con dominios VH humanos derivados de anticuerpos tetraméricos y una disminución en el carácter hidrófobo cuando se compara con dominios VH humanos derivados de anticuerpos tetraméricos, mientras que el número de

aminoácidos cargados ha aumentado en comparación con los dominios VH humanos derivados de anticuerpos tetraméricos. En todos los aspectos, es similar a los dominios VHH de camello y llama. La región CDR3 de los dominios VH humanos solubles (Figura 14) tienen una carga neta reducida en relación con los dominios VHH de llama y camélido y dominios VH humanos derivados de anticuerpos tetraméricos, mientras que el número de aminoácidos cargados es elevado cuando se compara con todos los demás. La región CDR3 de dominios VH humanos solubles tiene un carácter hidrófobo muy similar al VHH de llama, pero menor al observado en dominios VH presentes en anticuerpos tetraméricos humanos normales y anticuerpos tetravalentes de camello normales.

Los resultados muestran que, de la recombinación de VDJ inicial, hay selección de eventos de recombinación con un número mayor de aminoácidos cargados cuando se compara con anticuerpos tetraméricos humanos (CDR3). Esto es seguido por maduración por afinidad en las regiones CDR1 y CDR2 y en las tres regiones estructurales (FR1, FR2, FR3). Esto produce anticuerpos solo de cadena pesada humanos con dominios VH solubles que tienen un aumento en el carácter hidrófobo en FR1, pero una disminución en FR3 cuando se compara con dominios VH derivados de anticuerpos tetraméricos humanos. Hay muy poca diferencia en regiones FR2 o CDR1 y CDR2. Por lo tanto, el patrón global muestra que el carácter hidrófobo se extiende de manera diferente a través del dominio VH soluble (desplazado hacia FR1 y alejado de FR3 y CDR3) en relación con los dominios VH derivados de anticuerpos tetraméricos que son menos solubles y tienen una tendencia a agregarse. Este análisis no muestra si se hacen o no mutaciones particulares en posiciones particulares o regiones del dominio VH (véase el Ejemplo 6), pero hay características relacionadas con la distribución de carga y el carácter hidrófobo a través de los dominios VH humanos solubles que las distingue de los dominios VHH de llama y de camélido y dominios VH humanos derivados de anticuerpos tetraméricos.

Ejemplo 6. Estructuras 3D

El análisis del Ejemplo 4 indicó que los cambios en las regiones estructurales (FR1, FR2, FR3) del dominio VH humano soluble después de un reordenamiento de VDJ inicial se centraron en gran medida en posiciones particulares cuando se colocaron en la estructura tridimensional de un dominio VH humano derivado de un anticuerpo tetramérico (Figura 15).

En el dominio VH humano soluble se observaron mutaciones de FR1 de los aminoácidos 13-18, con predominancia para un cambio en la posición 13, produciendo elevado carácter hidrófobo, aún cuando el número de aminoácidos cargados, pero no la carga neta, es elevado. De manera importante, los cambios alrededor de la posición 13 se localizan en un bucle pequeño que tiene elevado carácter hidrófilo, supuestamente solubilidad cada vez mayor.

En FR2 de los dominios VH humanos solubles, hay un foco de atención claro alrededor de la posición 35 y uno alrededor de la posición 50, sin un cambio global en el carácter hidrófobo cuando se compara con los dominios VH derivados de anticuerpos tetraméricos humanos.

Los cambios en FR3 de los dominios VH solubles en relación con los dominios VH derivados de anticuerpos tetraméricos humanos coinciden con el extremo de la región CDR2 y la región alrededor del extremo de FR3 (inmediatamente próximo a CDR3).

Cuando estos cambios observados en los dominios VH humanos solubles derivados de HCABs se superponen a la estructura 3D del dominio VH, es inmediatamente evidente que las mutaciones de FR2 ocurren en las hojas plegadas en β que normalmente constituyen la superficie de interacción del dominio VH con el VL en anticuerpos tetraméricos. En FR1, los cambios también producen un dominio más hidrófobo. Los resultados sugieren que la mitad del extremo N del dominio VH tiene un carácter hidrófobo elevado para aumentar la estabilidad/solubilidad del dominio VH y compensar la ausencia de cadena ligera. Por el contrario, la mitad del extremo C es menos hidrófoba. Los cambios más importantes son una "redistribución" del patrón de carácter hidrófobo (extremo N más hidrófobo, extremo C menos hidrófobo, Figura 16) y mutaciones de la región estructural que afectan la interfase de cadena ligera anterior.

El desplazamiento global en el carácter hidrófobo y cambios en motivos específicos llevados a cabo por el sistema inmunitario de ratón permiten la generación de anticuerpos solo de cadena pesada solubles de alta afinidad y dominios VH solubles con características estructurales que los distinguen de los dominios VH propensos a la agregación derivada de anticuerpos tetraméricos humanos.

Ejemplo 7. Generación y clonación de expresión de anticuerpos humanos anti-HA

Los procedimientos de inmunización usados en el Ejemplo 7 son como se describen en los Ejemplos 1 y 2, excepto que la inmunización se lleva a cabo con HA de gripe (H3N2) como el antígeno. La inmunización se lleva a cabo por inyección de la proteína en ratones transgénicos que comprenden un locus de anticuerpo de cadena pesada completamente humano como se ha descrito en Janssens et al (2006) PNAS, 103, 15130-15135. Estos ratones portan 4 segmentos de VH humanos, todas de las regiones de cadena pesada D humanas, todas de las regiones JH y las regiones C γ 2 y C γ 3 humanas (Figura 1).

Las regiones CH1 han sido delecionadas de las regiones constantes C γ humanas para permitir la producción de anticuerpos solo de cadena pesada humanos como se ha descrito (Janssens et al (2006) PNAS, 103,15130-15135). Los ratones se inmunizan usando protocolos estándar y los anticuerpos se aíslan como se muestra esquemáticamente en la Figura 17.

5 Después de la inmunización, las células plasmáticas se recogen y se distribuyen (FACS) para la presencia del antígeno CD138 y la ausencia de marcadores de linaje por métodos estándar (véanse Sanderson et al (1989) Cell Regulation 1, 27-35; Kim et al (1994) Mol. Biol. Cell, 5, 797-805 y véase Kit de distribución magnética para el aislamiento de células plasmáticas CD138+ de ratón de Miltenyi Biotec). Se recogen las células y el ARNm se transcribe de forma inversa y se amplifica en ADNc con cebadores específicos de dominio VH por métodos estándar (por ejemplo, Janssens et al (2006) PNAS, 103, 15130-15135). Los cebadores usados están en el extremo 5' y son diseñados para introducir un sitio PvuII para fines de clonación (Figura 18). Los cebadores en el extremo 3' son de la región bisagra CH2 de IgG2 o IgG3 y son diseñados para tener un sitio BstEII. Si esto no es posible, el cebador para la IgG3 contiene un sitio SacI para fines de clonación (Figura 18). Los fragmentos de VH resultantes se clonan en dos vectores de expresión de mamífero que contienen un potenciador del CMV y un promotor de β -actina de pollo, seguido por una secuencia de Kozak y señal de VH3-23 que termina en su sitio PvuII en el segmento VH apropiado. En el primer vector (Figura 18), esto va seguido por IgG2 humana empezando en la región bisagra (del sitio BstEII) de CH2 con CH2, CH3, un codón de terminación y secuencia de poliA. En el segundo vector, todas las secuencias de IgG2 son reemplazadas por las secuencias de IgG3 humanas equivalentes. Las últimas permiten la clonación de HCABs que no contienen un sitio BstEII usando el sitio SacI como alternativa. El resto del plásmido tiene un marcador de selección de células de mamífero tal como un casete de resistencia a la higromicina en un plásmido basado en pUC. Obviamente, la IgG2 o 3 humana podría ser reemplazada por cualquier otra región constante deficiente en CH1 de humano o cualquier otra especie. Igualmente obvio, lo mismo es cierto para la parte VH del vector. El ADNc se clona entonces entre los sitios PvuII y BstEII (o PvuII y SacI) y el vector se transfecta en *E. coli* por técnicas estándar. Las colonias se recogen en placas de microtitulación de 96 (o 384) pocillos que contienen medio de crecimiento bacteriano. Las placas (normalmente >10) se incuban para permitir que las bacterias crezcan y se prepara ADN en cada pocillo. El ADN de cada pocillo, es decir, cada placa completa, se añade posteriormente a una placa de 96 pocillos nueva que contiene células HEK de mamífero (u otras células para fines de expresión) para la transformación por reactivos y métodos de transfección estándar. Las células transformadas se hacen crecer bajo selección basándose en el marcador de selección presente en el plásmido de expresión (por ejemplo, higromicina). El medio que contiene el anticuerpo expresado se analiza posteriormente para la presencia de HCAB específico de antígeno por ensayos de ELISA estándar. Esto se puede llevar a cabo en el mismo formato de 96 pocillos, pero también podría hacerse en otros formatos, por ejemplo, por micromatrices, para ahorrar en la cantidad de antígeno que tiene que usarse. Los pocillos positivos identifican inmediatamente los plásmidos que contienen un HCAB humano que codifica un HCAB específico de antígeno. La Figura 19 muestra el ELISA de los sueros de los ratones que se inmunizaron y ejemplos del ELISA de las células HEK transfectadas en el formato de 96 pocillos. También resume el experimento de clonación de HA, menor que una millonésima del ADNc se usó en el experimento usando 960 pocillos en total. Esto produjo 28 anticuerpos específicos de antígeno diferentes que se clasifican en 13 grupos por análisis de secuencia derivados de dos de las regiones de VH, VH3-11 (Figura 21) y VH3-23 (Figura 22). Se usan tanto IgG2 (SSERKCCVE) como IgG3 (SSELKTPGLG), las regiones de VH han sufrido hipermutación y, similar a humanos, la región J4 se usa con más frecuencia, aunque también se usan otras. Los HCAB secretados son solubles y son monómeros, como se determina por sus perfiles de elución en una columna SMART estándar (Figura 23). Las afinidades de los anticuerpos oscilan de afinidad nanomolar a subnanomolar como se determina por perfiles de unión y de disociación estándar en un análisis Octet (Figura 24) o BiaCore. El análisis de las mutaciones y la comparación con otras secuencias de inmunoglobulina (Figura 25) produce las mismas propiedades de las regiones diferentes como se muestra en las Figuras 11-13.

Como se describió antes, los dominios VH solubles pueden aislarse de HCAB soluble derivado de células plasmáticas.

50 **Ejemplo 8 Generación y clonación de expresión de HCAB humano a partir de células individuales**

Una variante del esquema descrito anteriormente por clonación directamente en células HEK sería distribuir las células negativas de linaje CD138+ y derivar el ADNc de células individuales que pudieran ser clonadas directamente en HEK u otras células de mamífero (Figura 26). Éstas serían analizadas por métodos muy similares como se describió antes.

60 **Ejemplo 9 Generación y clonación de expresión de anticuerpos (tetraméricos) de cadena pesada y ligera humanos normales a partir de células individuales**

También puede usarse una variante del método mostrado en el Ejemplo 8 para clonar anticuerpos tetraméricos normales expresados por transgén directamente por clonación de expresión en HEK u otras células de mamífero. En la variante, las células individuales se aíslan de nuevo por distribución. El ARN se aísla de células individuales y tanto los dominios VH como VL se clonan por amplificación por PCR en un vector de expresión de cadena pesada y ligera análogo al que se describió anteriormente. La combinación individual de los plásmidos de expresión de cadena pesada y ligera clonados se transfecta en conjunto en células HEK u otras de mamífero. Los formatos, el

ES 2 563 321 T3

criado y el análisis son completamente análogos a los anteriormente descritos para el formato de 96 pocillos de HCAb (Ejemplos 8 y 9).

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un anticuerpo solo de cadena pesada que se une específicamente a un antígeno que comprende:
- 5 (a) inmunizar un mamífero transgénico no humano con el antígeno, en el que el mamífero expresa anticuerpos solo de cadena pesada que carecen de un dominio CH1 en el ARNm de cadena pesada transcrito y procesado, y en el que los anticuerpos solo de cadena pesada se expresan de un locus transgénico en el mamífero;
- 10 (b) aislar células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria del mamífero inmunizado;
- (c) aislar una población de ARNm de células derivadas de la etapa (b);
- (d) clonar una población de ADNc derivado del ARNm aislado en la etapa (c) en un vector de expresión y que expresa el vector de expresión en una línea celular;
- 15 (e) seleccionar por lo menos una línea celular que produce un anticuerpo solo de cadena pesada que se une específicamente al antígeno;
- en el que el mamífero es un ratón o una rata.
2. Un método de producción de un dominio V_H soluble o una proteína de fusión V_H que se une específicamente a un antígeno que comprende:
- 20 (a) inmunizar un mamífero transgénico no humano con el antígeno, en el que el mamífero expresa anticuerpos solo de cadena pesada que carecen de un dominio CH1 en el ARNm de cadena pesada transcrito y procesado, y en el que los anticuerpos solo de cadena pesada se expresan de un locus transgénico en el mamífero;
- (b) aislar células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria del mamífero inmunizado;
- 25 (c) aislar una población de ARNm de células derivadas de la etapa (b);
- (d) clonar una población de ADNc que comprende ADNc que codifican un dominio V_H derivado del ARNm de la etapa (c) en un vector de expresión de tal manera que un dominio V_H o una proteína de fusión V_H, que puede comprender una región efectora de cadena pesada, se exprese en la línea celular; y
- (e) seleccionar por lo menos una línea celular que produce un dominio V_H o una proteína de fusión V_H que se une específicamente al antígeno,
- 30 en el que el mamífero es un ratón o una rata.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el mamífero transgénico no humano expuesto al antígeno es un ratón, y las células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria se purifican de las glándulas linfáticas secundarias, médula ósea o bazo del ratón.
- 35 4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que las células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria se purifican usando marcadores de superficie celular sobre las células.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el mamífero transgénico no humano expuesto al antígeno es un ratón y el marcador de superficie celular es el marcador CD138.
- 40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la línea celular es una línea celular microbiana o una línea celular de mamífero.
- 45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa (d) comprende transfectar dicho vector de expresión en bacterias en un formato automatizable de alto rendimiento, amplificar dichas bacterias, aislar el vector de expresión y transfectar el vector de expresión en células de expresión.
- 50 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria se immortalizan antes del aislamiento de ARNm.
9. El método de la reivindicación 8, en el que las células se immortalizan por fusión con una célula de mieloma, o por transformación con un virus, tal como el EBV.
- 55 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que cualquier locus de anticuerpo solo de cadena pesada incluye al menos un gen marcador selectivo dominante.
- 60 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que incluye además la etapa de aislar tanto el dominio V_H soluble como un ácido nucleico que codifica el dominio V_H soluble de un linfocito B o una línea celular immortalizada que produce un anticuerpo solo de cadena pesada o proteína de fusión V_H de la especificidad de antígeno deseada.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que incluye además la etapa de aislar tanto un dominio V_H soluble como un ácido nucleico que codifica un dominio V_H soluble de una célula productora de anticuerpos solo de cadena pesada producida por el mamífero o de una célula inmortalizada productora de anticuerpos solo de cadena pesada o proteína de fusión V_H producida por el mamífero por un enfoque de presentación.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

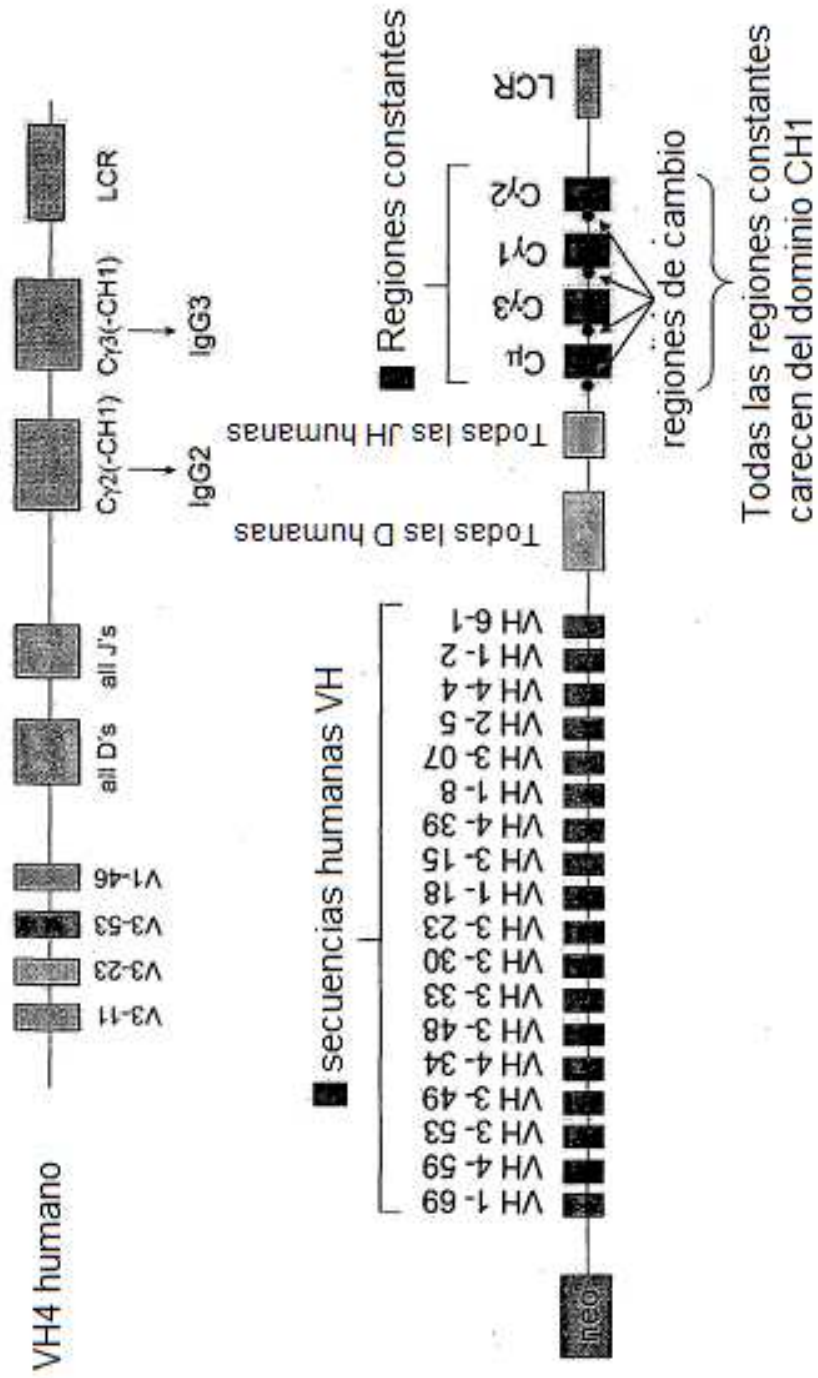
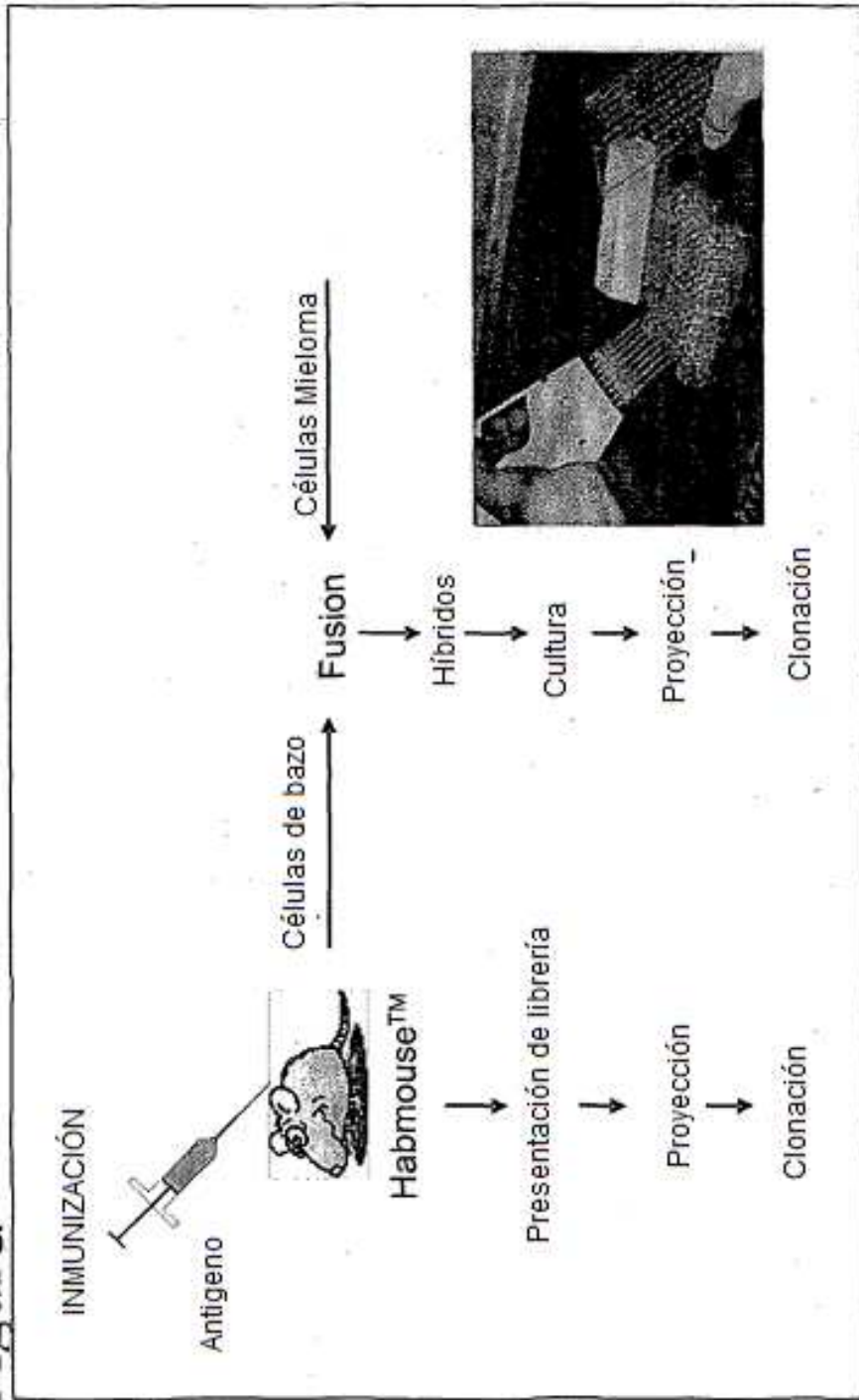


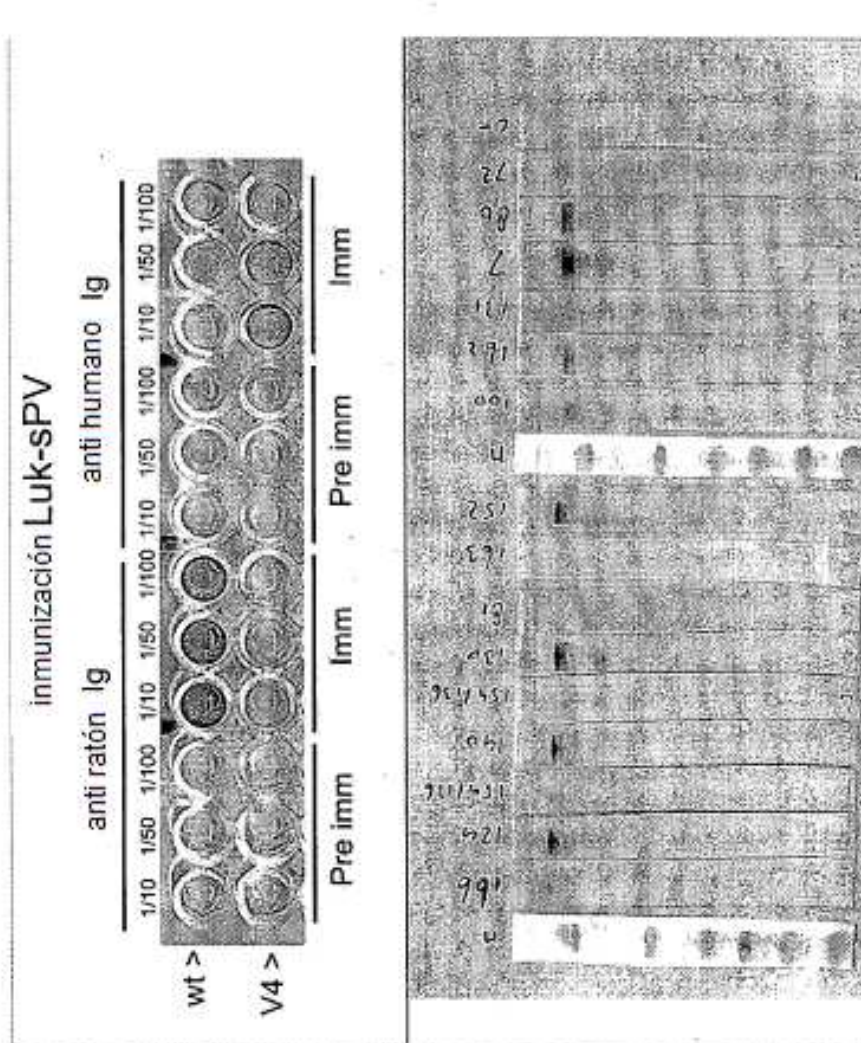
Figura 2



3-23 EVQLLESG
 Liama QVQLLESG
 3D3 QVQLLESG
 3D10 EVQLLESG

Los dos pri
 debidos a l
 Los amino:
 Los amino:
 Los residu
 reordenam
 Los subray

Figura 3



Transferencia western de clones dominantes VH positivos de Luk-sPV aislado por presentación de fagos.

Figura 4

	CDR1	CDR2	CDR3-DJ etc
3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSRIRASCAASGFTTFFYANGSVRQAFGKLEWVAISGGGFTYADSVGGRTTFRONSXNTLTIQMSLRRAEATAYVCAK.....		
LIATA	QVQLLESGGELVQPGGSLRLSCAASGSIFFSIINAWYRQRFQRELVAAITSGSE TNYADSVGGRTTFRONAKNTYTIQMSLRPEPTAVYYCH		
3D3	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFFYANGSVRQAFGKLEWVAISGGGFTYADSVGGRTTFRONSXNTLTIQMSLRRAEATAYVCAKDRYGGGGFDYWGCGTLVYSSERKCCVEAA		
3D10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCRAAGFTTFFYANGSVRQAFGKLEWVAISGGGFTYADSVGGRTTFRONSXNTLTIQMSLRRAEATAYVCAKDRYGGGGFDYWGCGTLVYSSERKCCVEAA		

secuencia 3-23 de línea germinal

3D3 – IgG2
3D10 – IgG3

- Los dos primeros aminoácidos de 3D3 serán ignorados. Los cambios son probablemente debidos a la degeneración del cebador.
- Los aminoácidos resaltados en negro son mutaciones diferentes de 3-23 o entre clones.
- Los aminoácidos en negrita cursiva son cada 10 aminoácidos.
- Los residuos subrayados doble son diferencias entre los clones con el mismo reordenamiento VDJ.
- Los subrayados simples CDR1, CDR2 y CDR3 etc.

Figura 7

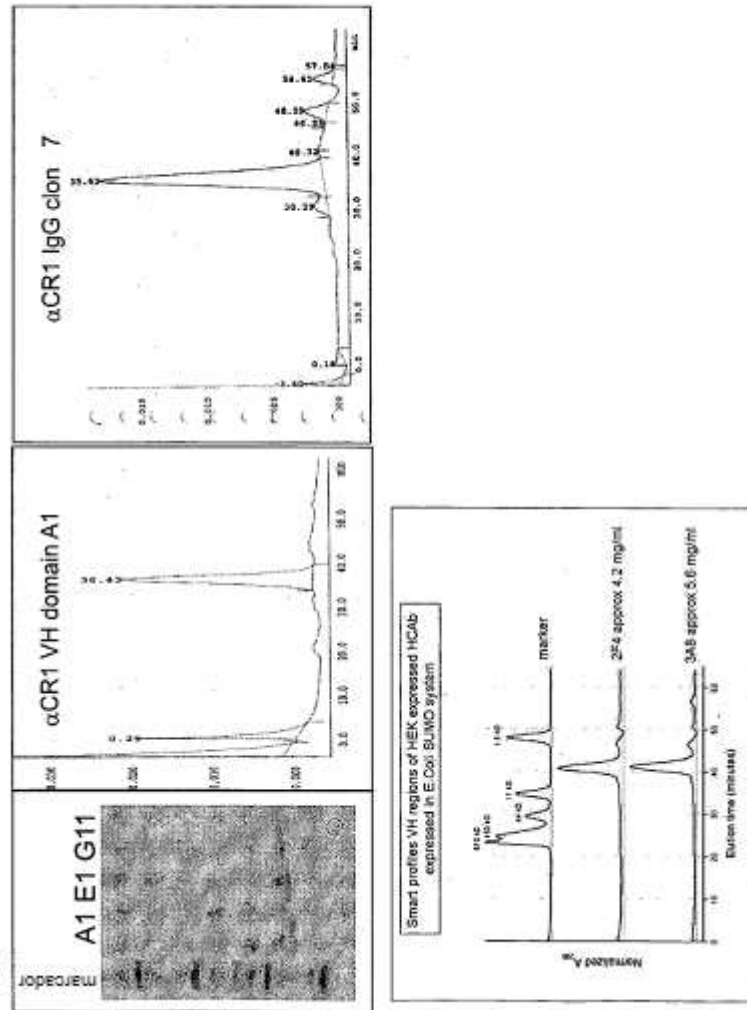


Figura 8

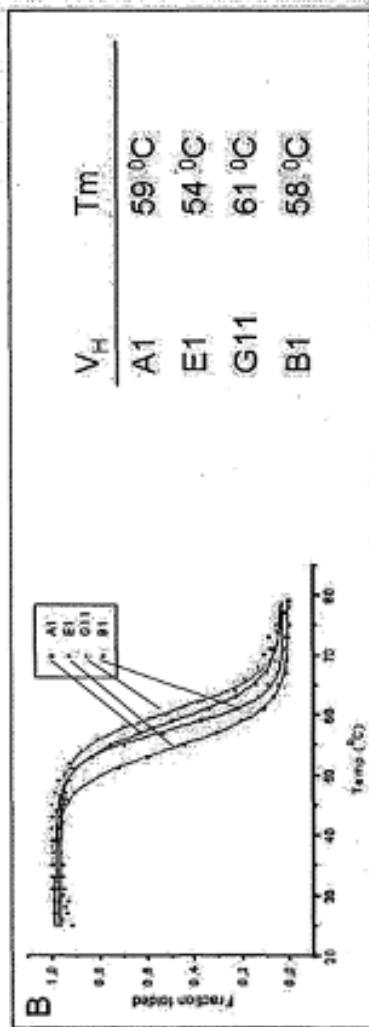
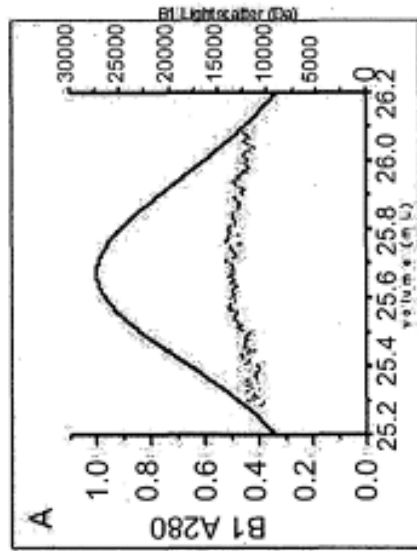


Figura 9

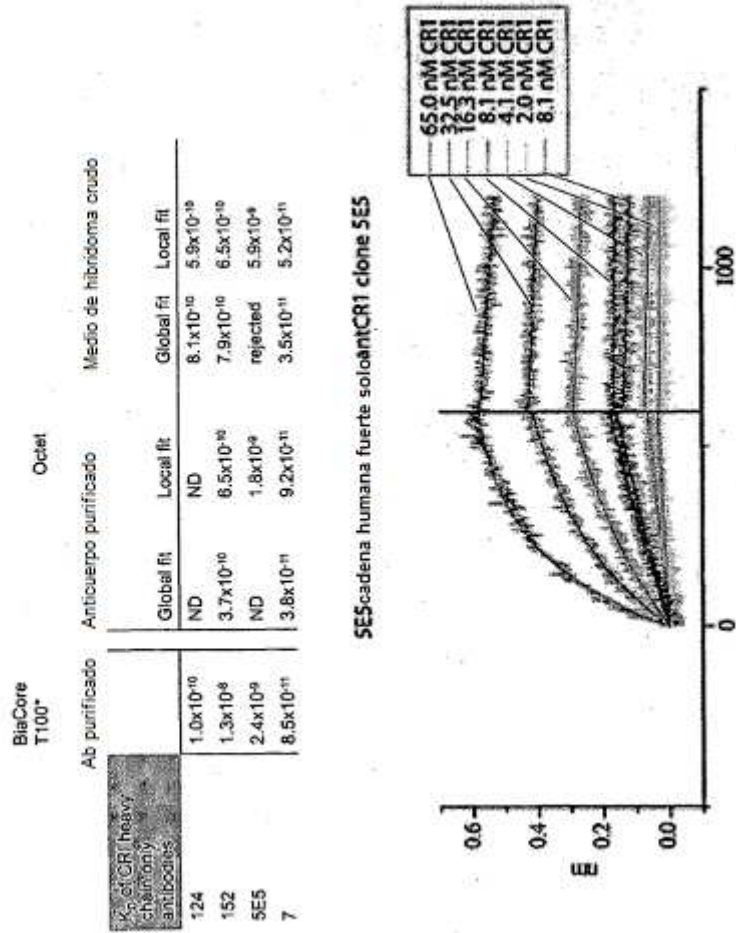
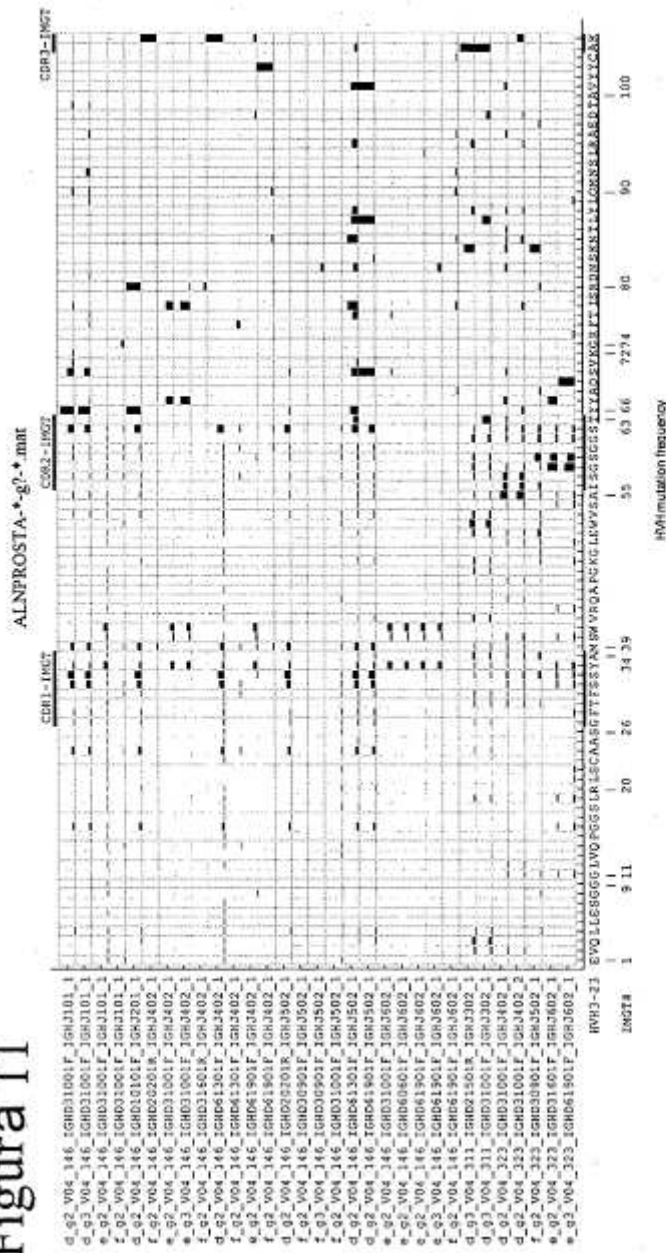


Figura 10

Solubilidad de α CR1 VH dominio	
A1	4.6 mg/ml
A9	11.5 mg/ml
B1	5.1 mg/ml
E1	5.3 mg/ml
G11	5.8 mg/ml

Figura 11



Las secuencias fueron obtenidas hacia adelante (aminocidos 1 a 62) e inversamente (aminocidos 63 a 100) secuenciadas. Las secuencias fueron clasificadas por regiones D y J (numeración izquierda ej. D31 o J1 en la secuencia superior). Las mutaciones indicadas son promedios de mutaciones que ocurren en una posición particular. Las blancas indican sin mutación, mientras que un incremento del tamaño de la barra negra indica un incremento de la frecuencia de mutación en esa posición. Inmediatamente aparente además de la esperada las regiones de mutación CDR1, 2 y 3 son marcos de frecuencia de mutaciones. Numerados de acuerdo con el estándar de IMGT.

Figure 12

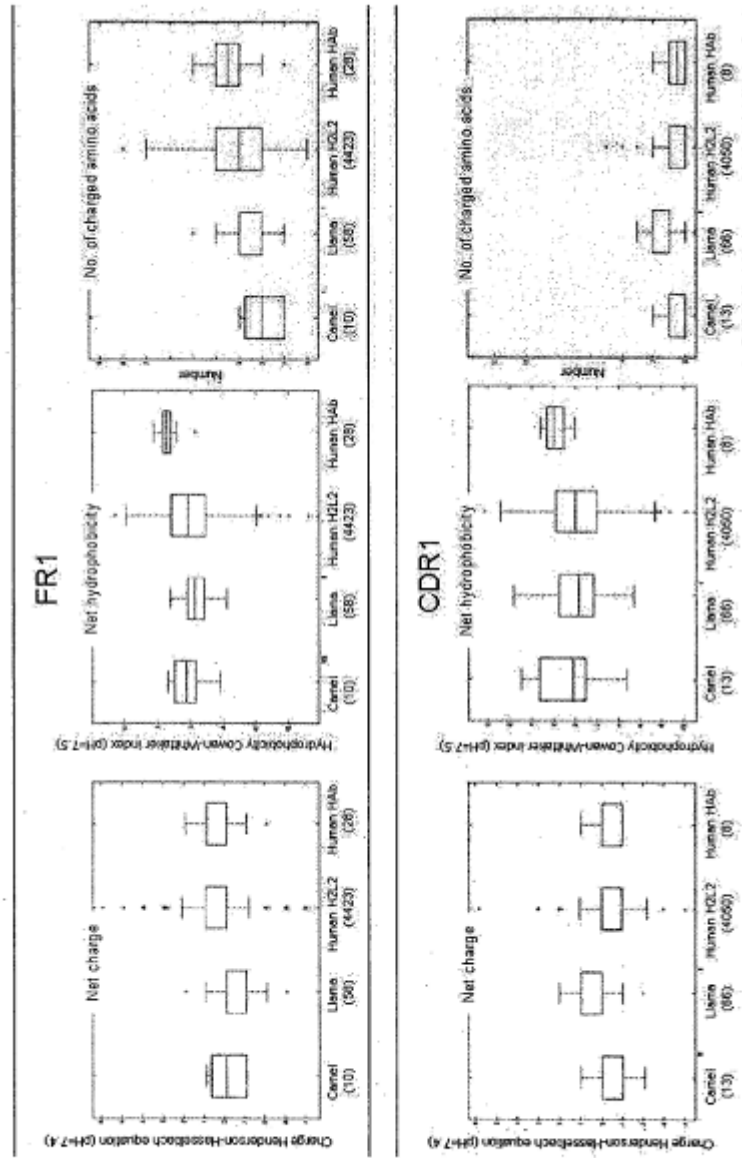


Figura 13

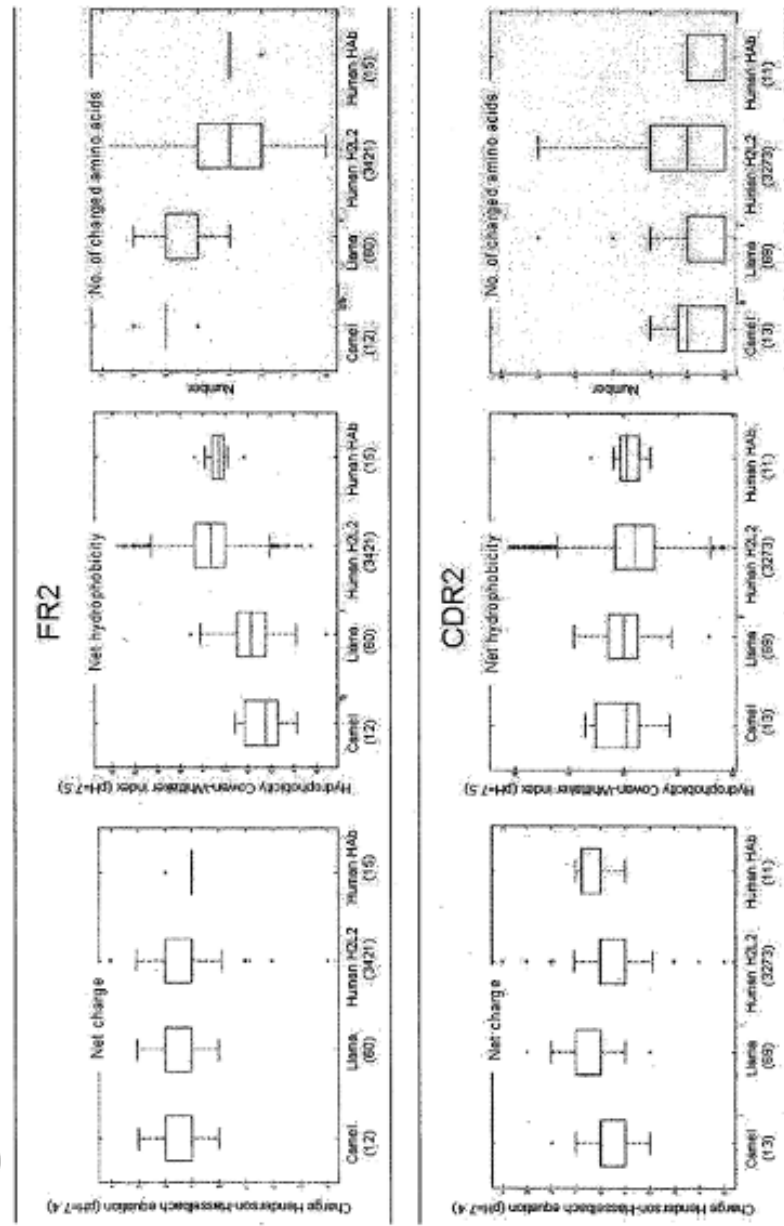


Figura14

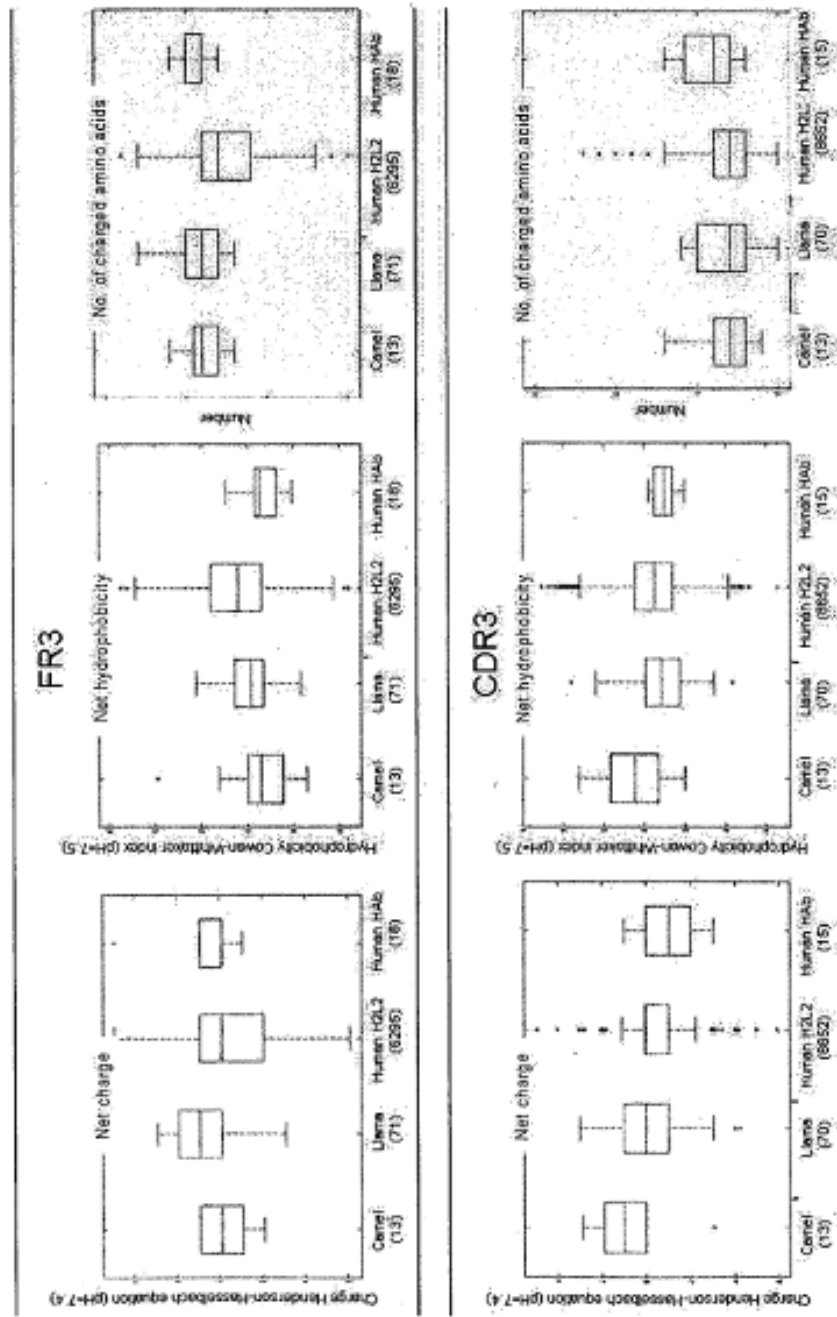


Figure 15

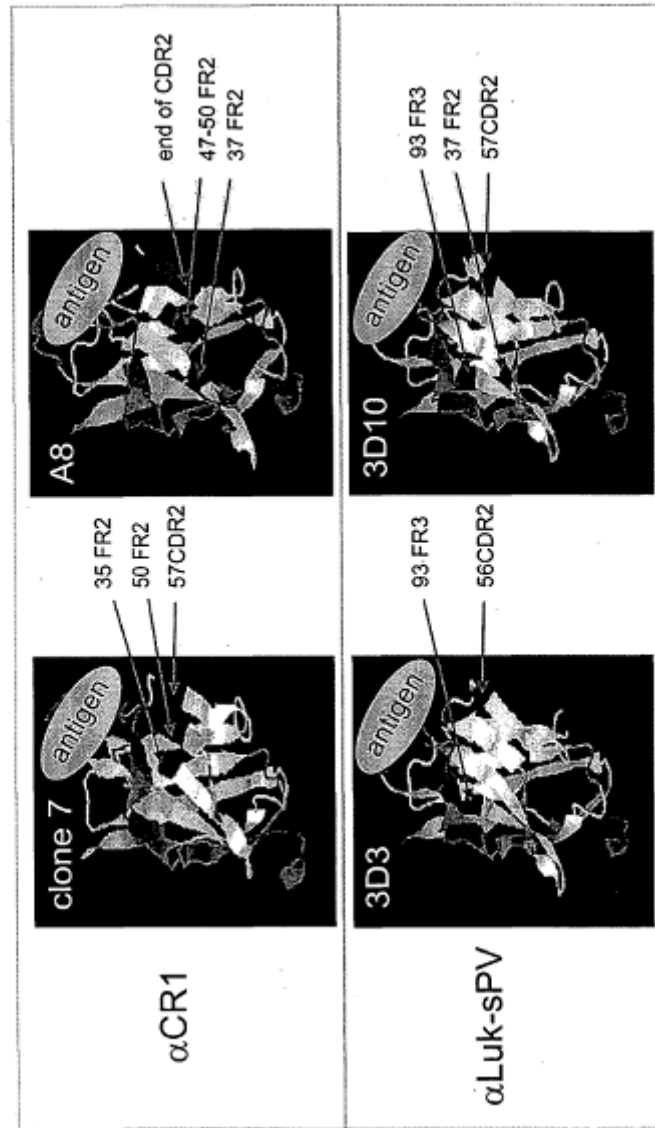


Figura 16

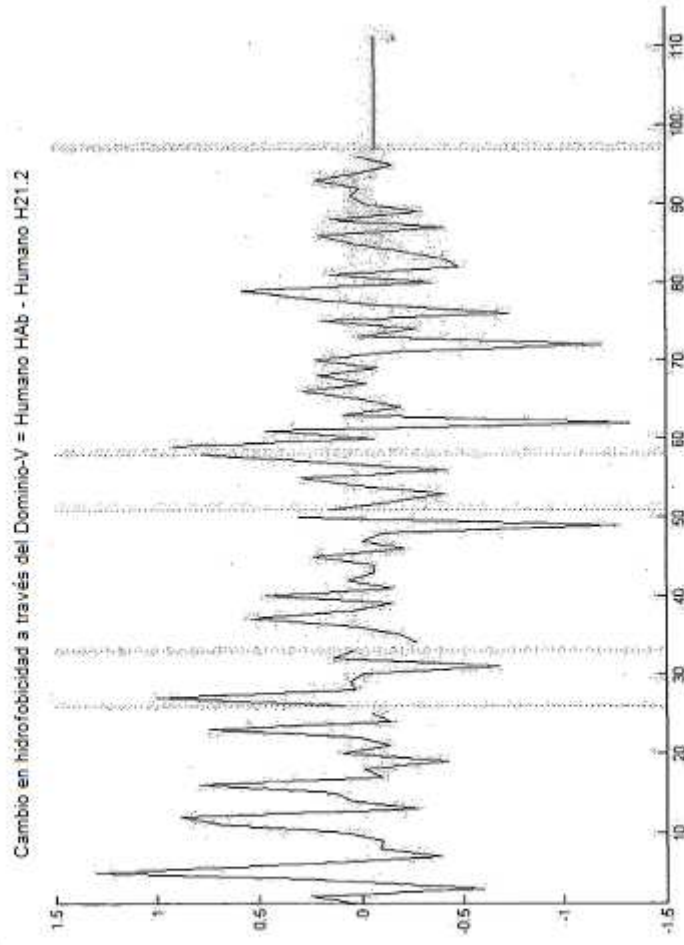


Figura 17

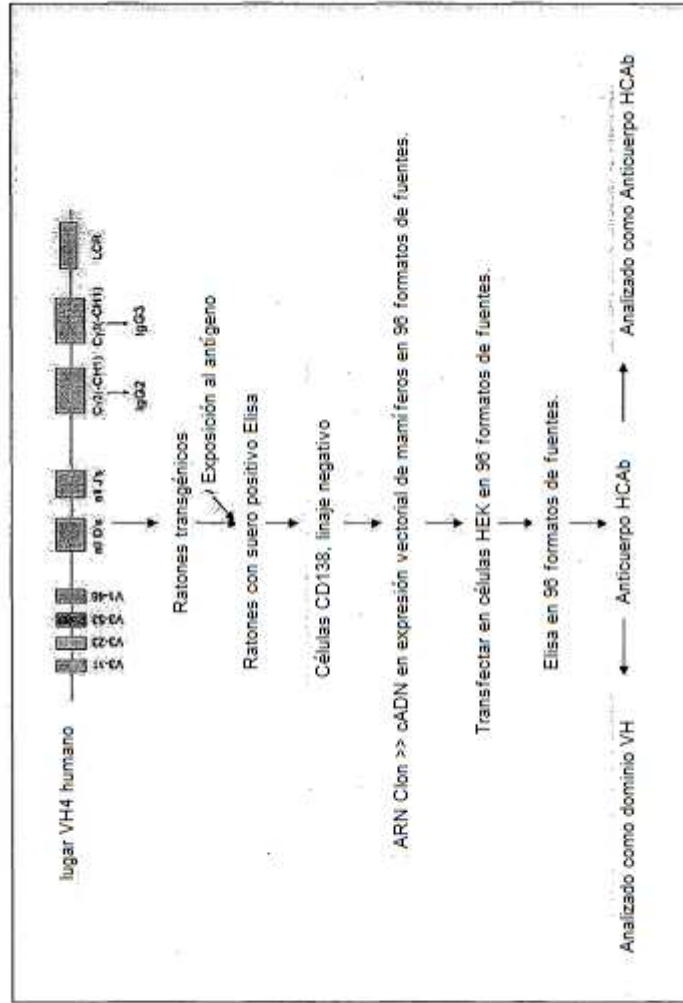


Figura 18

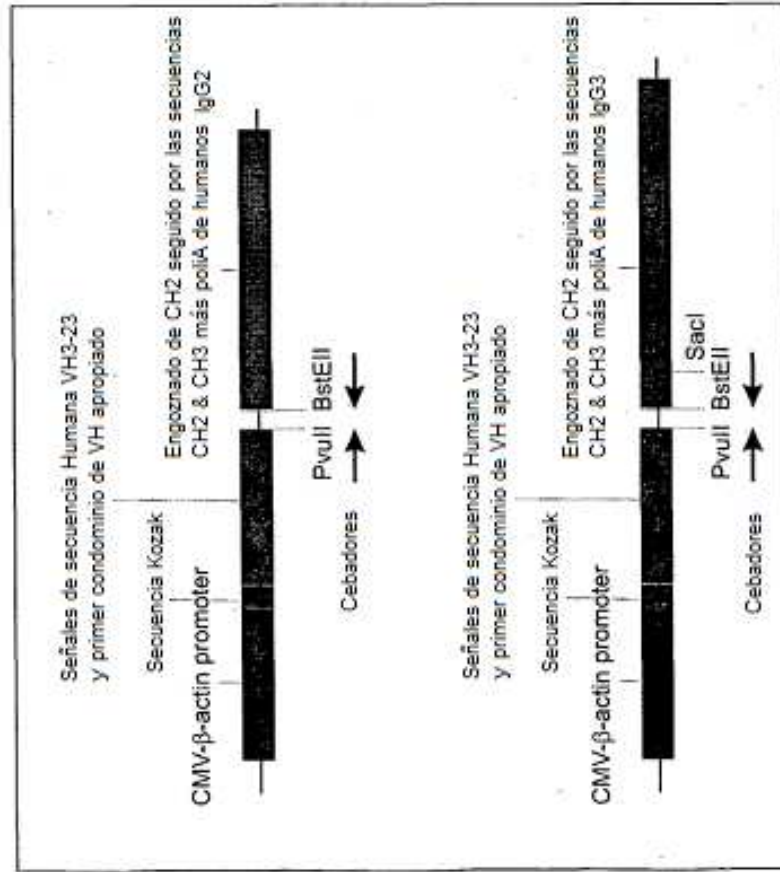


Figura 19

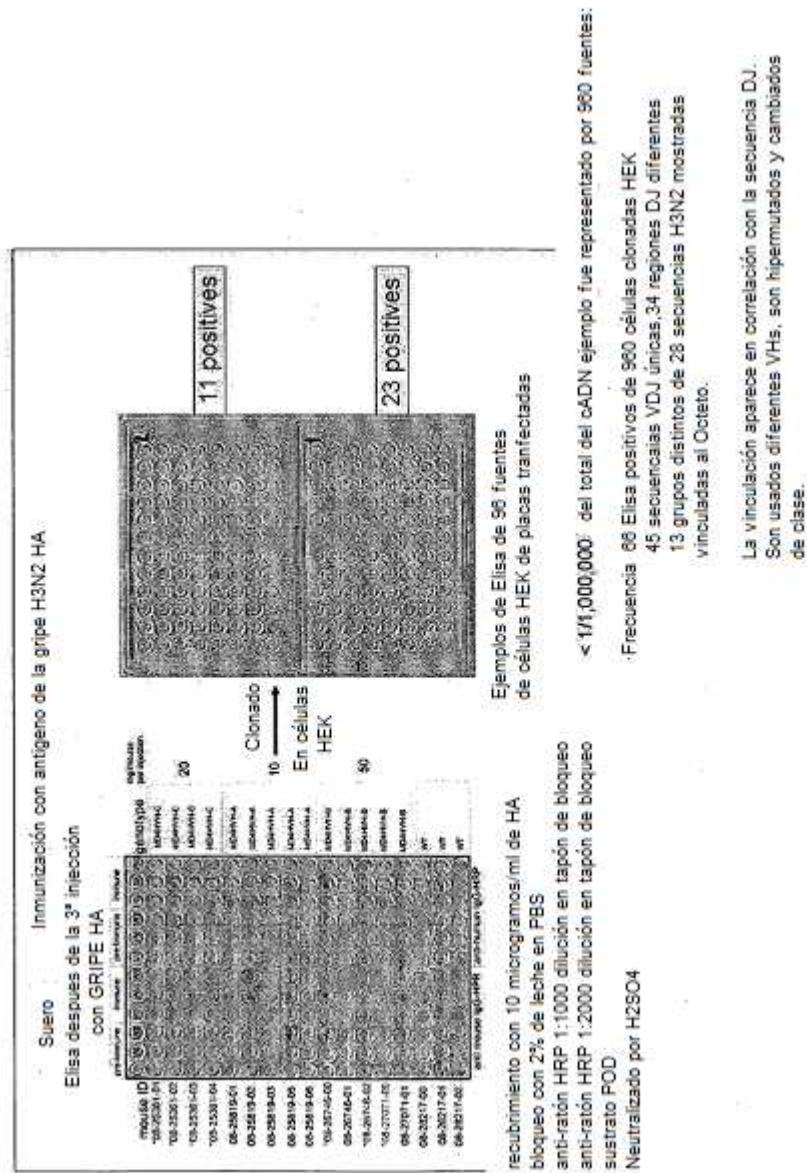


Figura 21

3-23	CDR1	CDR2	CDR3	hinge
1
H3N2 (1F3)	EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCASGETTS FAMSW R QNPORGLERVS T GGG T YADSYNGRFTTIRDSNRNTLVLQNSLRAREDAVYIC KSNVAGS K GGDTLMTYSSERKCCVE
H3N2 (4G9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCASGETTS FAMSW R QNPORGLERVS T GGG T YADSYNGRFTTIRDSNRNTLVLQNSLRAREDAVYIC KSNVAGS K GGDTLMTYSSERKCCVE
H3N2 (3C8)	EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCASGETTS FAMSW R QNPORGLERVS T GGG T YADSYNGRFTTIRDSNRNTLVLQNSLRAREDAVYIC KSNVAGS K GGDTLMTYSSERKCCVE

Figura 22

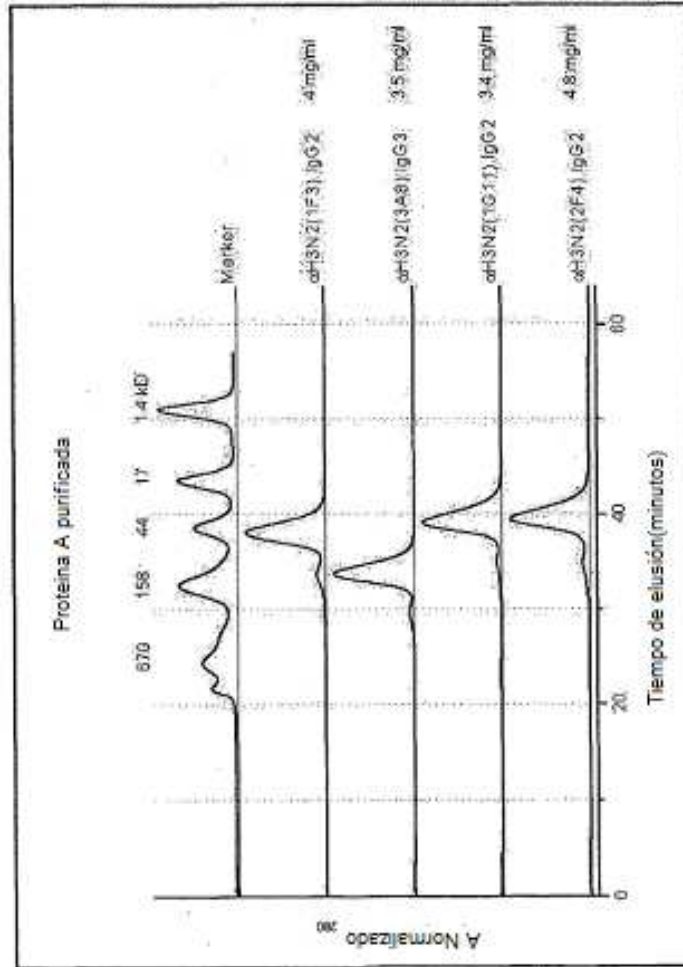


Figura 23a. Afinidades de anticuerpos octeto directamente de medio de transfección HEK en la muestra Ab

α H3N2(2F4)

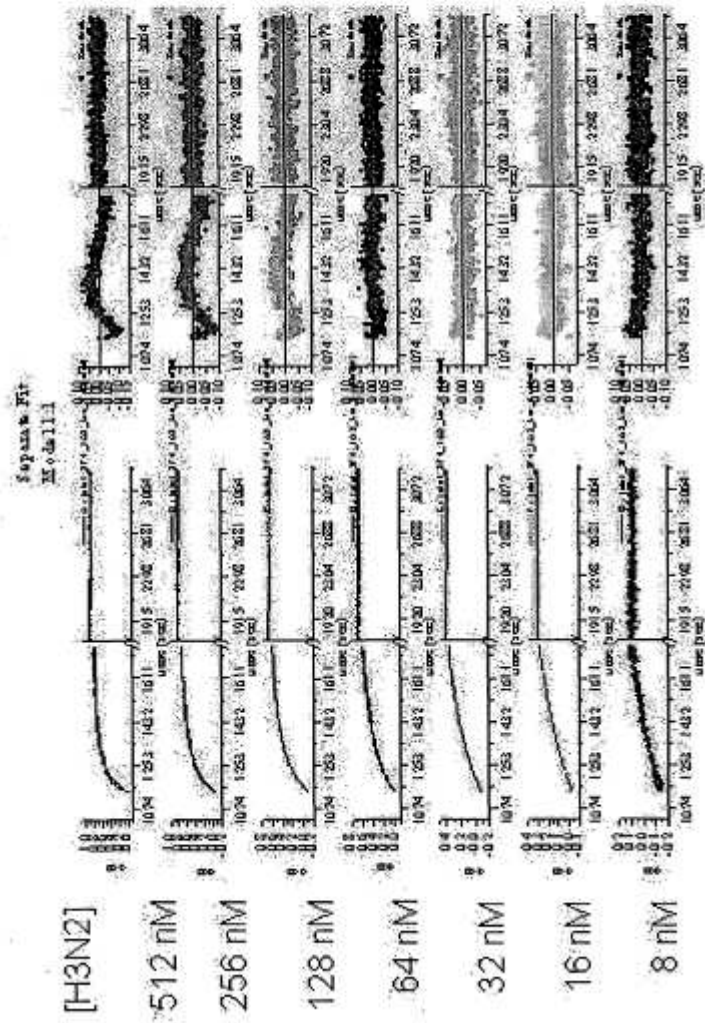


Figura 23b Afinidades de anticuerpos octeto directamente de medio de transfección HEK en la muestra Ab

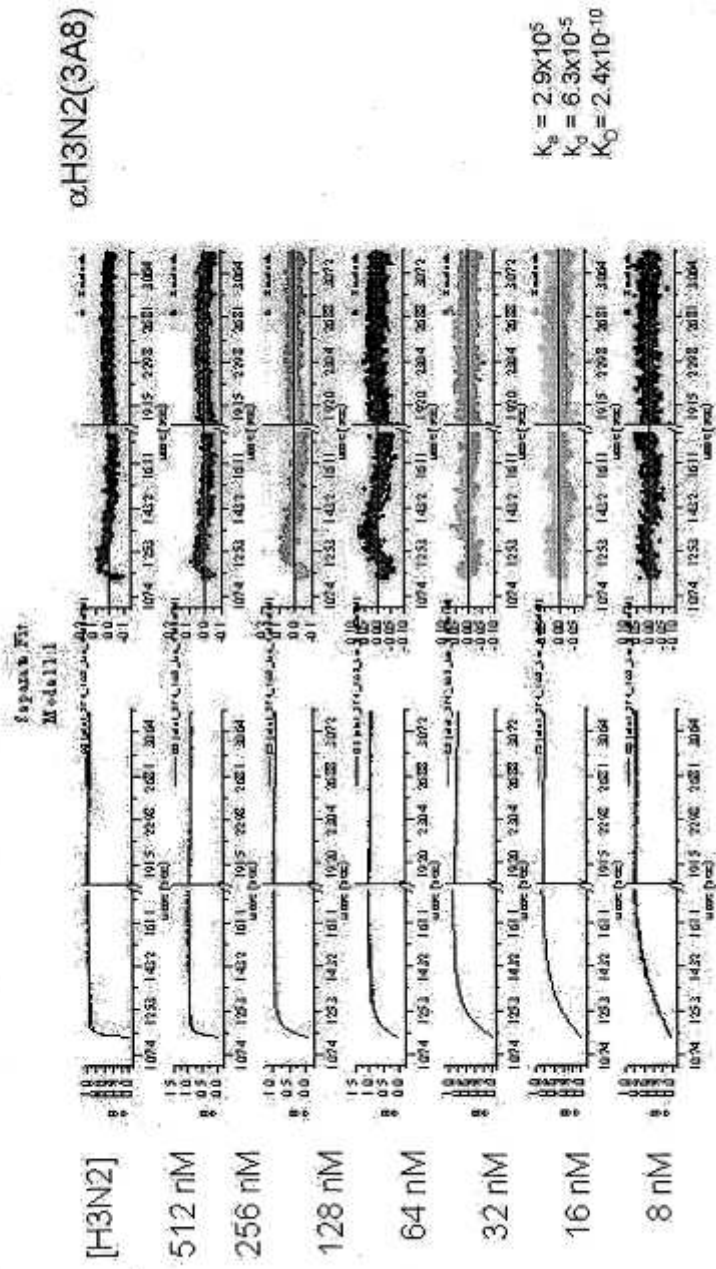


Figura 24a

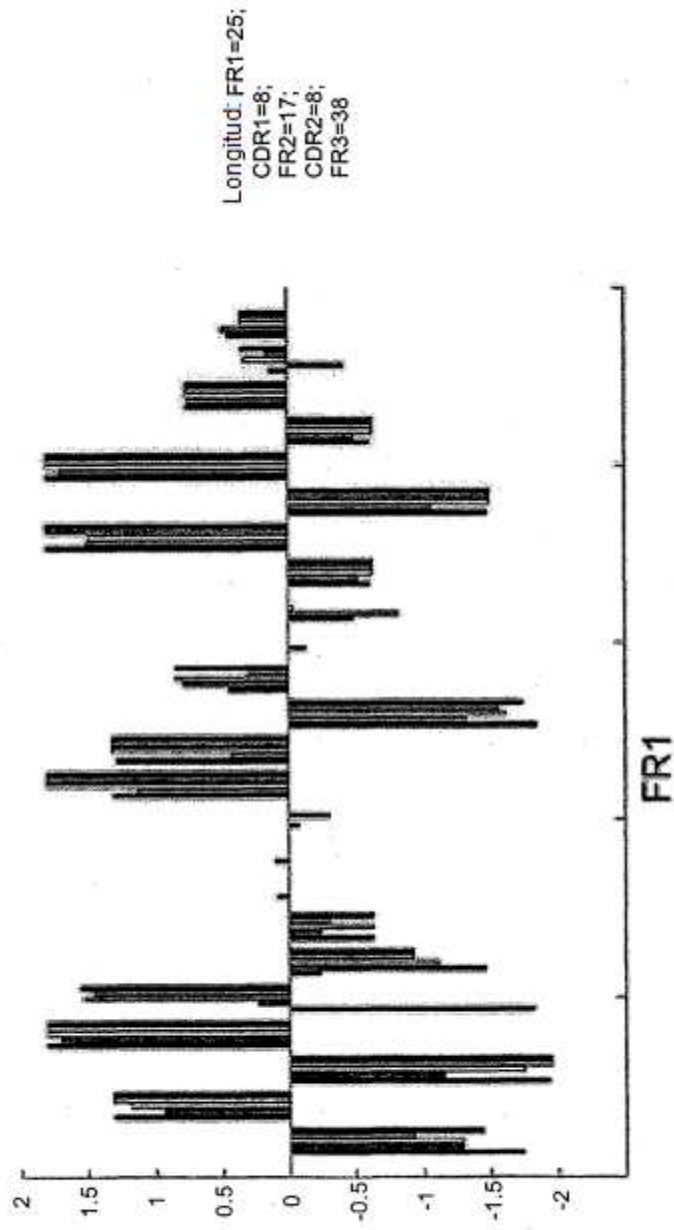


Figura 24b

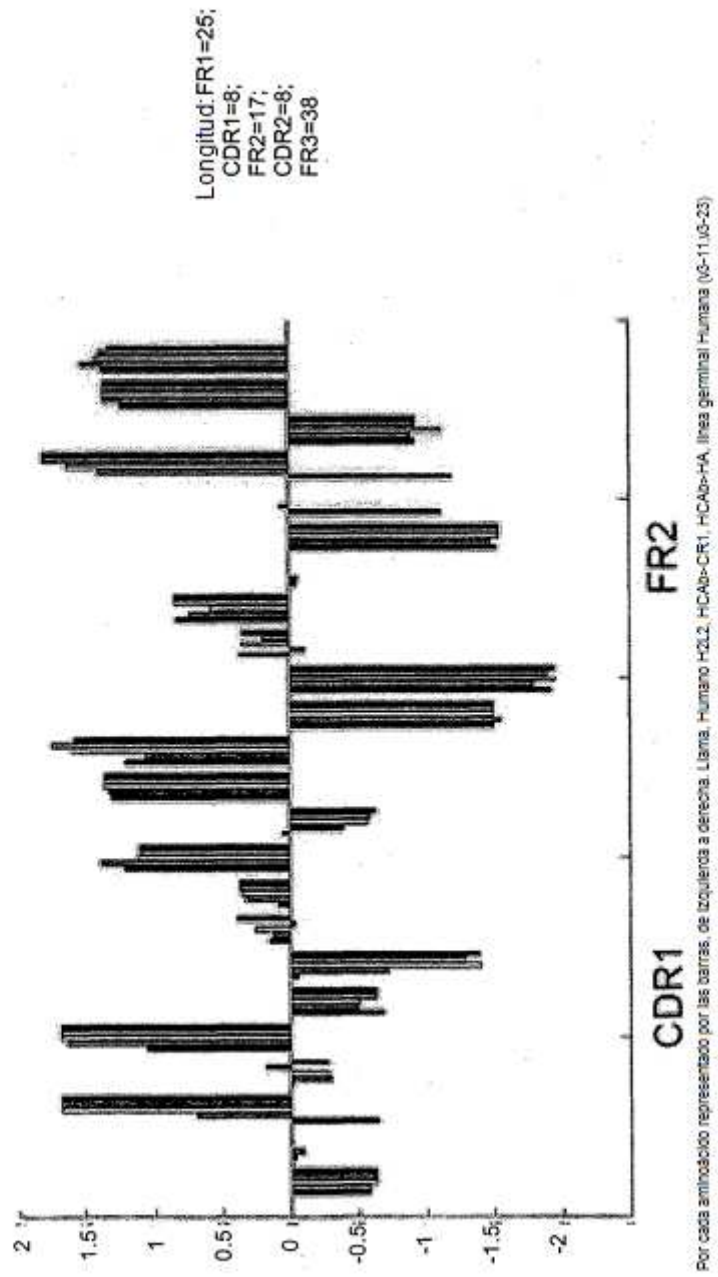


Figura 24c

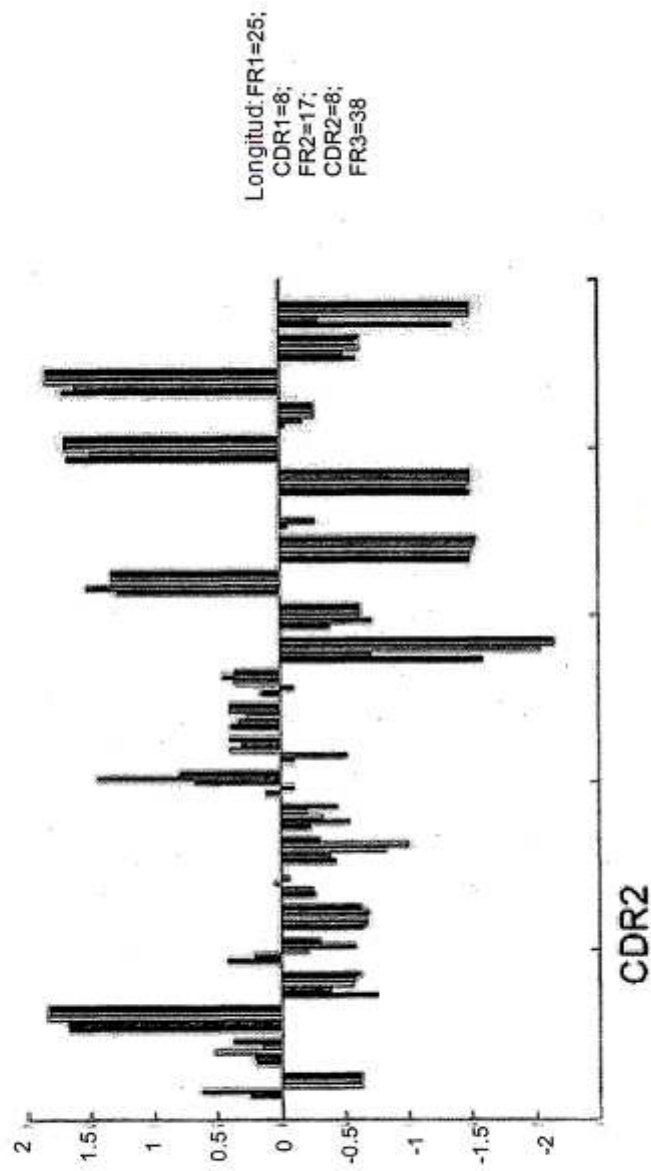
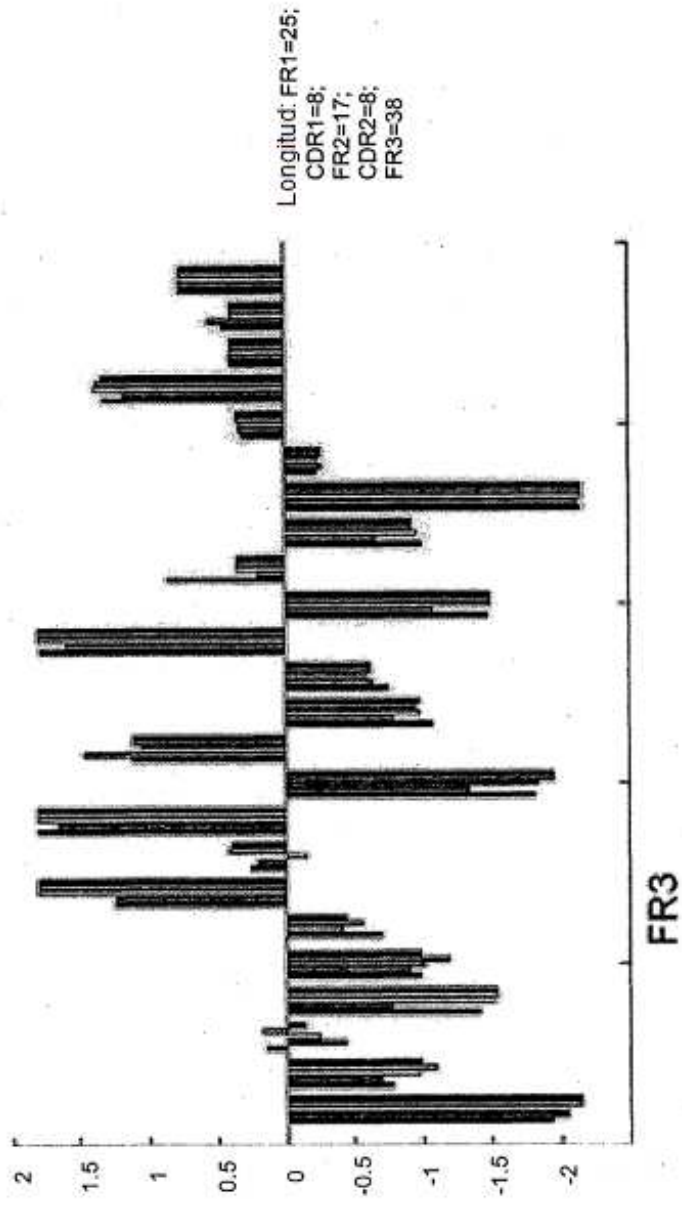


Figura 24d



Por cada aminoácido representado por las barras, de izquierdas a derecha, H1CA6-HA, H2CA6-CR1, H2CA6-HA, línea germinal Humana (G3-11/G3-23)

Figura 25

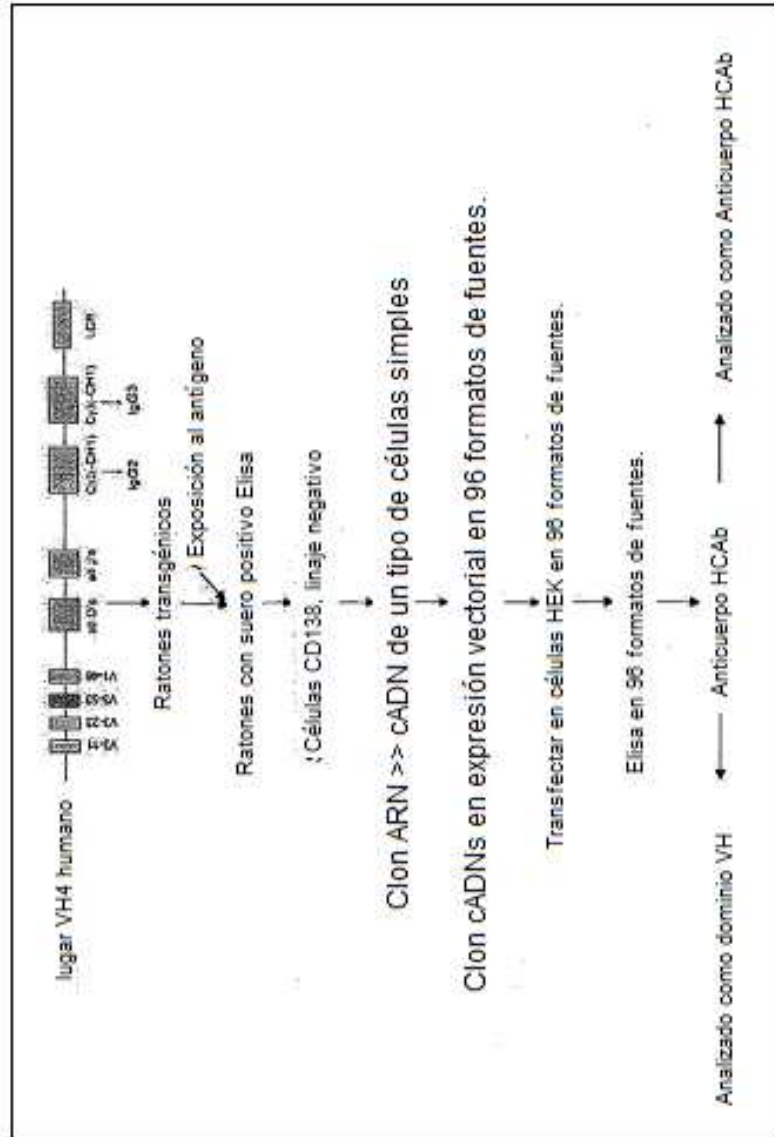


Figura 26

