

(11) Número de Publicação: **PT 1776383 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/00 (2014.01) **A01K 67/27** (2014.01)
C12N 5/10 (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2005.07.22**

(30) Prioridade(s): **2004.07.22 GB 0416392**
2005.06.10 GB 0511881

(43) Data de publicação do pedido: **2007.04.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.08.20**
231/2014

(73) Titular(es):

ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM
DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY AND
GENETICS, P.O.BOX 1738 3000 DR
ROTTERDAM NL
ROGER KINGDON CRAIG GB

(72) Inventor(es):

ROGER KINGDON CRAIG GB
FRANKLIN G. GROSVELD NL
RICHARD W. JANSSENS NL
DUBRAVKA DRABEK NL

(74) Mandatário:

LUISA MARIA FERREIRA GUERREIRO
RUA RAUL PROENÇA, 3 2820-478 CHARNECA DA
CAPARICA PT

(54) Epígrafe: MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM O FABRICO DE UM REPERTÓRIO DIVERSO DE ANTICORPOS APENAS DE CADEIA PESADA FUNCIONAIS QUE SOFREM MATURAÇÃO DE AFINIDADE, E AS SUAS UTILIZAÇÕES. A INVENÇÃO TAMBÉM SE RELACIONA COM O FABRICO E UTILIZAÇÃO DE UM REPERTÓRIO DIVERSO DE ANTICORPOS APENAS DE CADEIA PESADA DE CLASSE ESPECÍFICA E AO FABRICO E UTILIZAÇÃO DE COMPLEXOS MULTIVALENTES COM A FUNCIONALIDADE DE POLIPEPTÍDEO DE ANTICORPO DE CADEIA PESADA, DE PREFERÊNCIA A FUNCIONALIDADE DE LIGAÇÃO DO ANTICORPO DE CADEIA PESADA, A ATIVIDADE EFECTORA DA REGIÃO CONSTANTE E, OPCIONALMENTE, FUNÇÕES EFECTORAS ADICIONAIS. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A UM MÉTODO DE GERAÇÃO DE ANTICORPOS APENAS CADEIA PESADA TOTALMENTE FUNCIONAIS SOMENTE EM RATINHOS TRANSGÉNICOS, EM RESPOSTA AO DESAFIO ANTIGÉNICO. EM PARTICULAR, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA A GERAÇÃO DE ANTICORPOS APENAS DE CADEIA PESADA ESPECÍFICOS PARA O ANTIGÉNIO HUMANO, COM UMA ELEVADA AFINIDADE, DE QUALQUER CLASSE, OU UMA MISTURA DE CLASSES E O ISOLAMENTO E EXPRESSÃO DE DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO VH AO ANTIGÉNIO INTEIRAMENTE FUNCIONAIS.

RESUMO
MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO

A presente invenção relaciona-se com o fabrico de um repertório diverso de anticorpos apenas de cadeia pesada funcionais que sofrem maturação de afinidade, e as suas utilizações. A invenção também se relaciona com o fabrico e utilização de um repertório diverso de anticorpos apenas de cadeia pesada de classe específica e ao fabrico e utilização de complexos multivalentes com a funcionalidade de polipeptídeo de anticorpo de cadeia pesada, de preferência a funcionalidade de ligação do anticorpo de cadeia pesada, a atividade efectora da região constante e, opcionalmente, funções efectoras adicionais. A presente invenção também se refere a um método de geração de anticorpos apenas cadeia pesada totalmente funcionais somente em ratinhos transgénicos, em resposta ao desafio antigénico. Em particular, a presente invenção refere-se a um método para a geração de anticorpos apenas de cadeia pesada específicos para o antigénio humano, com uma elevada afinidade, de qualquer classe, ou uma mistura de classes e o isolamento e expressão de domínios de ligação VH ao antigénio inteiramente funcionais.

DESCRIÇÃO

MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um método para a produção de domínios de ligação V_H em ratinhos transgénicos.

Antecedentes da Invenção

Os anticorpos monoclonais ou variantes dos mesmos representarão uma elevada proporção dos novos medicamentos lançados no século XXI. A terapia de antícorpo monoclonal já é aceite como uma via preferida para o tratamento de artrite reumatoide e doença de Crohn e existe um progresso impressionante no tratamento do cancro. Produtos à base de anticorpos também estão em desenvolvimento para o tratamento de doenças cardiovasculares e infecciosas. Produtos de anticorpos monoclonais mais comercializados reconhecem e ligam um epítopo único e bem definido no ligando-alvo (por exemplo, TNF α). A produção de anticorpos monoclonais humanos para terapia continua dependente de cultura de células de mamíferos. A montagem de um complexo constituído por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves (H₂L₂) e complexos processos de glicosilação pós-tradução subsequentes excluem a utilização de sistemas bacterianos. Os custos de produção e os custos de capital para a produção de anticorpos por cultura de células de mamífero são elevados e ameaçam limitar o potencial das terapias à base de anticorpos na ausência de alternativas aceitáveis. Uma variedade de organismos transgénicos é capaz de expressar anticorpos totalmente funcionais. Estes incluem plantas, insetos, galinhas, cabras e gado, mas

nenhum ainda foi utilizado para a fabricação de produtos terapêuticos comercializados.

Os fragmentos de anticorpo funcionais podem ser fabricados em *E.coli*, mas o produto geralmente tem baixa estabilidade no soro a menos que peguilado durante o processo de fabricação.

Complexos de anticorpos biespecíficos são concebidos em moléculas à base de Ig capazes de se ligar a dois epítopos diferentes em ambos os抗igenos dos mesmos ou diferentes. Proteínas de ligação bispecíficas que incorporam anticorpos isolados ou em combinação com outros agentes de ligação são promissoras para modalidades de tratamento onde funções imunológicas humanas capturadas induzem um efeito terapêutico, por exemplo, a eliminação de agentes patogénicos (Van Spriel et al., (1999) J. Infect. Diseases, 179, 661-669; Tacken et al, (2004) J. Immunol, 172, 4934-4940; US 5487890), o tratamento do cancro (Glennie e van der Winkel, (2003) Drug Discovery Today, 8, 503-5100); e imunoterapia (Spriel Van et al, (2000) Immunol Today, 21, 391-397; Segal et al, (2001) J. Immunol Methods, 248, 1-6; Lyden et al, (2001) Nat. Med., 7, 1194-1201).

Problemas de fabricação são compostos onde um produto biespecífico de anticorpos baseado em dois ou mais complexos H₂ L₂. Por exemplo, a co-expressão de dois ou mais conjuntos de genes de cadeia pesada e leve podem resultar na formação de até 10 combinações diferentes,

apenas uma das quais é o heterodímero desejado (Suresh et al., (1986) Methods Enzymol., 121, 210-228).

Para resolver esse problema, uma série de estratégias têm sido desenvolvidas para a produção em células de mamíferos de formatos IgG biespecíficos de comprimento total (BsIgG) que retêm a função efetora de cadeia pesada. BsIgGs requerem cadeias pesadas manipuladas de "botão e buracos" para impedir a formação do heterodímero e a utilização de cadeias L idênticas para evitar a não complementaridade da cadeia L (Carter, (2001) Immunol. Methods, 248, 7-15). Estratégias de reticulação química alternativas também têm sido descritas para a produção de complexos de fragmentos de anticorpos, cada um reconhecendo抗igénios diferentes (Ferguson et al., (1995), Arthritis and Rheumatism, 38, 190-200) ou a ligação cruzada de outras proteínas de ligação, por exemplo, colectinas, aos fragmentos de anticorpos (Tacken et al., (2004) J. Immunol., 172, 4934-4940).

O desenvolvimento de diacorpos ou minianticorpos (BsAb) a que geralmente faltam as funções efectoras de cadeia pesada também supera a redundância do heterodímero. Estas incluem anticorpos de cadeia simples mínimas que incorporam sítios de ligação VH e VL (scFv), que subsequentemente dobram e dimerisam para formar um anticorpo bivalente biespecífico monovalente para cada um dos seus抗igénios alvo (Holliger et al., (1993) PNAS, 90, 6444-6448; Muller et al., (1998) FEBS Lett., 422, 259-264). Num exemplo, CH1 e os domínios constantes de L foram utilizados como domínios de heterodimerização para a formação de mini-anticorpos bi-

específicos (Muller et al., (1998) FEBS Lett., 259-264). Uma variedade de métodos recombinantes baseados em sistemas de expressão de *E. coli* têm sido desenvolvidos para a produção de BsAbs (Hudson, (1999) Curr. Opin. Immunol., 11, 548-557), no entanto, parece que o custo e a escala de produção de material de anticorpo multivalente de grau clínico permanece o impedimento principal para o desenvolvimento clínico (Segal et al., (2001) J. Immunol. Methods, 248, 1-6).

Recentemente, o conceito de BsAb tem sido estendido para englobar Di-diacorpos, anticorpos biespecíficos tetravalentes onde os domínios V_H e V_L em cada cadeia H e L foram substituídos pelos pares manipulados de domínios de ligação de scFv. Estas construções, enquanto complexos manipulados, podem ser montadas em células de mamíferos em cultura na ausência de redundância do heterodímero (Lu et al., (2003) J. Immunol. Methods, 279, 219-232).

A estrutura de imunoglobulinas é bem conhecida na técnica. A maioria das imunoglobulinas naturais compreende duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. As cadeias pesadas são unidas umas às outras através de pontes de dissulfeto entre os domínios de charneira localizados aproximadamente a meio caminho ao longo de cada cadeia pesada. A cadeia leve está associada com cada cadeia pesada no lado do terminal N do domínio de charneira. Cada cadeia leve está normalmente ligada à respectiva cadeia pesada por uma ligação dissulfureto perto do domínio de charneira.

Quando uma molécula de Ig está corretamente dobrada, cada cadeia dobra-se numa série de domínios globulares distintos ligados por uma sequência polipeptídica mais linear. Por exemplo, a cadeia leve dobra-se numa variável (V_L) e num domínio constante (C_L). As cadeias pesadas possuem um único domínio variável V_H , adjacente ao domínio variável da cadeia leve, um primeiro domínio constante, um domínio de charneira e dois ou três outros domínios constantes. Interações da cadeia pesada (V_H) e leve (V_L) de domínios variáveis de cadeia resultam na formação de uma região de ligação ao抗原 (Fv). Geralmente, tanto V_H e V_L são necessários para a ligação ao抗原, embora dímeros de cadeias pesadas e fragmentos do terminal amino foram mostrados reter a atividade na ausência de cadeia leve (Jaton et al., (1968) *Biochemistry*, 7, 4185- 4195).

Com o advento de novas técnicas de biologia molecular, a presença de anticorpos apenas de cadeia pesada (desprovidos de cadeias leves), foi identificada em distúrbios proliferativos de células-B no homem (doença da cadeia pesada) e em sistemas de modelo de murino. Análise de doenças de cadeia pesada, a nível molecular mostrou que as mutações e deleções ao nível do genoma podem resultar na expressão inapropriada do domínio da cadeia pesada C_H1 , dando origem à expressão de cadeia pesada do anticorpo a que falta a capacidade para se ligar à cadeia leve (ver Hendershot et al, (1987) *J. Cell Biol.*, 104, 761-767; Brandt et al, (1984) *Mol Cell Biol.*, 4, 1270-1277).

Estudos separados em domínios V_H humanos isolados derivados de bibliotecas de fagos demonstraram a

ligação para o抗igeno específico de domínios V_H , mas estes domínios V_H provaram ser de baixa solubilidade. Além disso, sugeriu-se que a seleção de domínios V_H humanos com características de ligação específica apresentados em matrizes de fagos poderia formar blocos de construção para anticorpos modificados (Ward et al., (1989) Nature, 341, 544-546).

Estudos utilizando outras espécies de vertebrados têm mostrado que camelídeos, como resultado de mutações nos genes naturais, produziram apenas dímeros de IgG2 e IgG3 funcional de cadeia pesada que são incapazes de se ligar à cadeia leve, devido à ausência da região de ligação de cadeia leve C_H1 (Hamers-Casterman et al., (1993) Nature, 363, 446-448) e que espécies, tais como o tubarão produzem uma família de proteínas de ligação apenas de cadeia pesada, provavelmente, relacionado com o receptor de células T de mamífero ou de cadeia leve de imunoglobulina (Stanfield et al., (2004) Science, 305, 1770-1773).

Um aspecto caracterizante dos anticorpos apenas de cadeia dos camelídeos é o domínio V_H dos camelídeos, que proporciona uma melhor solubilidade em relação ao domínio V_H humano. V_H humano pode ser manipulado para características melhoradas de solubilidade (ver Davies e Riechmann, (1996) Protein Eng, 9 (6), 531-537; Lutz e Muyllemans, (1999) J. Immuno Methods, 231, 25-38) ou a solubilidade possa talvez ser adquirida por seleção natural *in vivo* (ver Tanha et al., (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780). No entanto, onde os domínios de ligação V_H foram derivados a partir de bibliotecas de fagos, as

afinidades intrínsecas para o抗igénio permanecem na gama micromolar baixa para a nanomolar elevada, apesar da aplicação de estratégias de melhoramento de afinidade envolvendo, por exemplo, a afinidade de randomização hot spot (Yau et al., (2005) J. Immunol. Methods, 297, 213-224).

Anticorpos V_H de camelídeos são também caracterizados por um anel de CDR3 modificado. Este anel de CDR3 é, em média, mais do que o encontrado em anticorpos de não camelídeos e é uma característica considerada uma grande influência sobre a afinidade e especificidade de抗igénio em geral, o que compensa a ausência de um domínio V_L na espécie de anticorpo apenas de cadeia pesada nos camelídeos (Desmyter et al., (1996) Nat. Struct. Biol., 3, 803-811, Riechmann e Muyldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 23, 25-28).

Estudos estruturais recentes sobre os anticorpos de camelídeos sugerem que a diversidade de anticorpos é em grande parte impulsionada por processos de maturação *in vivo* com a dependência de eventos de recombinação V(D)J e mutação somática (De Genst et al ,. (2005) J. Biol. Chem. (14), 14114-14121).

Recentemente, os métodos para a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada em animais transgénicos têm sido desenvolvidos (ver WO02/085945 e WO02/085944). Anticorpo apenas de cadeia pesada funcional potencialmente de qualquer classe (IgM, IgG, IgD, IgA ou IgE) e derivado de qualquer mamífero (incluindo o homem) pode ser produzido a

partir de animais transgénicos (ratinhos, de preferência) como resultado dum estímulo de antígenio.

O lócus da cadeia pesada da imunoglobulina normal comprehende uma pluralidade de segmentos de genes V, um conjunto de segmentos do gene D e um número de segmentos de genes J. Cada um dos segmentos do gene V codifica a partir do terminal N quase para o terminal C de um domínio V. A extremidade do terminal C de cada domínio V é codificada por um segmento do gene D e um segmento do gene J. O rearranjo VDJ em células B, seguido por maturação por afinidade fornece domínios de ligação V_H , que em seguida, com domínios de ligação V_L , formam um reconhecimento do antígeno ou local de ligação. A interação das cadeias leves e pesadas é facilitada pela região C_{H1} da cadeia pesada e pela região λ ou κ da cadeia leve.

Para a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada, o lócus da cadeia pesada de linha germinal comprehende segmentos de genes que codificam para algumas ou todas as possíveis regiões constantes. Durante a maturação, um domínio de ligação V_H reorganizado é para o splicing segmento que codifica a região constante C_{H2} , para fornecer um gene rearranjado que codifica uma cadeia pesada, que carece de um domínio $C_H 1$ e, por conseguinte, é incapaz de se associar com uma cadeia leve de imunoglobulina.

Os anticorpos monoclonais apenas de cadeia pesada podem ser recuperados a partir de células B de baço por tecnologia padrão de clonagem ou recuperados a partir de mARN de

células-B pela tecnologia de exibição de fagos (Ward et al., (1989) *Nature*, 341, 544-546). Anticorpos apenas de cadeia pesada derivados de animais transgénicos ou camelídeos são de alta afinidade. A análise da sequência de tetrâmeros normais de H_2L_2 demonstra que a diversidade resulta principalmente a partir de uma combinação do rearranjo VDJ e hipermutação somática (Xu e Davies, (2000) *Immunity*, 13, 37-45). A análise da sequência de ARNm de apenas a cadeia pesada expressa, quer produzida em camelídeos ou animais transgénicos, apoia esta observação (De Genst et al., (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 14114-14121).

Uma característica importante e comum das regiões V_H de camelídeos naturais e humanos é que cada região se liga como um monómero com nenhuma dependência de dimerização com uma região V_L de solubilidade ideal e afinidade de ligação. Estas características têm sido anteriormente reconhecidas como sendo particularmente adequadas para a produção de agentes de bloqueio e agentes de penetração do tecido.

Homo ou heterodímeros também podem ser gerados por clivagem enzimática de anticorpos de cadeia pesada, ou apenas por vias sintéticas (Jaton et al., (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195 e US2003/0058074 A1). No entanto, os benefícios de um domínio de ligação monomérica do anticorpo ainda têm de ser utilizados com vantagem na criação de proteínas multiméricas, como reagentes terapêuticos e de diagnóstico.

V_H humano ou V_{HH} de camelídeos produzidos pela tecnologia de exibição de fagos não tem a vantagem de características melhoradas como resultado de mutações somáticas e a diversidade adicional fornecida pela recombinação da região D e J na região do CDR3 do local de ligação do anticorpo normal (Xu e Davies, (2000) *Immunity*, 13, 37-45). V_{HH} de camelídeos, enquanto mostra os benefícios da solubilidade em relação ao V_H humano, é antigénico no homem e devem ser gerado por imunização dos camelídeos ou pela tecnologia de exibição de fagos.

A incorporação de domínios de ligação V_H tem clara vantagem sobre a utilização de scFv que devem ser modificados a partir de domínios V_H e V_L com o potencial associado de perda de especificidade e avidez. Domínios de ligação V_H derivados de famílias de genes relacionados, tais como receptores de células T ou a família de imunoglobulina do tubarão também proporcionam alternativas ao scFv para a geração de moléculas de ligação bi- ou multi-específicas. Outras proteínas de ligação que ocorrem naturalmente e os domínios daí resultantes, incluindo, por exemplo, fragmentos de receptores solúveis podem também ser utilizados.

Classes de anticorpos diferem na sua função fisiológica. Por exemplo, a IgG desempenha um papel dominante na resposta imune madura. IgM está envolvido na fixação do complemento e aglutinação. A IgA é a principal classe de Ig em secreções - lágrimas, saliva, colostro, muco - e assim desempenha um papel importante na imunidade local. A inclusão de regiões constantes de cadeia pesada de

classe específica quando complexos de ligação multivalentes modificados oferecem os benefícios terapêuticos da função efectora *in vivo* dependente da funcionalidade requerida. A manipulação das regiões efectores individuais também pode resultar na adição ou deleção de funcionalidade (Van Dijk e van der Winkel, Curr. Opin. Chem. Biol., (2001) 5 de Agosto (4), 368-374). Parece provável que a produção ideal e seleção de anticorpos apenas de cadeias pesadas que compreendem domínios de ligação V_H de alta afinidade (seja humano ou de camelídeos ou de outra origem) irá beneficiar de abordagens alternativas para os que dependem da seleção de bibliotecas de fagos randomizados que não facilitam a recombinação *in vivo*, e a maturação de afinidade.

Assim, a inclusão da funcionalidade região constante IgA poderia proporcionar uma melhor função da mucosa contra os patógenos (Leher et al., (1999) Exp. Eye Res., 69, 75-84), enquanto a presença da funcionalidade região constante de IgG1 proporciona melhor estabilidade no soro *in vivo*. A presença de domínios constantes de cadeia pesada C_H2 e C_H3 fornece a base para a dimerização estável como se vê em anticorpos naturais, e proporciona locais de reconhecimento para a glicosilação pós-tradução. A presença de C_H2 e C_H3, também permite que o reconhecimento secundário do anticorpo quando os complexos biespecíficos e multivalentes são usadas como reagentes e diagnóstico.

Sequências isoladas da região variável apenas de cadeia pesada pré-rearranjadas de camelídeos foram previamente clonadas em frente de uma região de charneira e do domínio efector de IgG1 humana, inseridos em vectores e expresso em

células de COS para gerar anticorpos. Os anticorpos expressos neste ambiente *in vitro* já foram submetidos a processos de comutação classe (isotipo) e de maturação de afinidade (hipermutação) *in vivo* no camelo e podem ligar-se ao antigénio (Riechmann e Muyldeermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231 , 25-38).

A WO 2004/049794 descreve anticorpos de cadeia simples, um ratinho transgénico e os anticorpos de cadeia simples produzidos por um tal ratinho transgénico.

Continua a haver uma necessidade na técnica para gerar domínios de ligação V_H funcional apenas de cadeias pesadas, que retêm o potencial máximo de ligação ao antigénio para utilização em diversas aplicações clínicas, de investigação e industriais.

Breve Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona um método para a produção de um domínio de ligação V_H solúvel específico do antigénio, que permanece em solução e é ativo num meio fisiológico, que compreende:

(a) a injeção de um antigénio num ratinho transgénico que expressa um lócus heterólogo de cadeia pesada V_H , em que:

(i) o lócus da cadeia pesada V_H compreende uma região variável que compreende pelo menos um segmento do gene V_H de ocorrência natural, pelo menos, um segmento do gene D, pelo menos um segmento do gene J e pelo menos uma região

constante de cadeia pesada, e em que os segmentos do gene V, D e J são derivados a partir de um humano;

(ii) cada região constante não codifica um domínio funcional C_H1;

(iii) um segmento do gene V, um segmento do gene D e um segmento do gene J são capazes de se recombinarem para formar uma sequência de codificação de VDJ;

(iv) o lócus de cadeia pesada V_H recombinado, quando expresso, é capaz de formar, um anticorpo apenas de cadeia pesada solúvel compreendendo um domínio de ligação V_H solúvel específico do抗原 e uma região efectora constante desprovida de um domínio funcional C_H1;

e:

(b1) o isolamento de uma célula ou tecido que expressa, um anticorpo apenas de cadeia pesada específico do抗原 de interesse;

(c1) a produção de um hibridoma a partir da célula ou do tecido do passo (b1);

(d1) a identificação e isolamento de um domínio V_H específico de抗原 clonado a partir do mARN do passo (c1),

ou:

(b2) o isolamento de uma célula ou tecido que expressa, um anticorpo apenas de cadeia pesada específico do抗原 de interesse;

(c2) a clonagem da sequência que codifica o domínio V_H (s) a partir de mARN derivado a partir da célula ou tecido isolado;

(d2) exibição da proteína codificada usando um fago ou biblioteca similar;

(e2) a identificação específica do domínio V_H do抗igénio; e

(f2) expressão do domínio V_H isoladamente ou como uma proteína de fusão em sistemas de expressão alternativos bacterianos ou de levedura.

De preferência, o sistema de expressão no passo (f2) é um sistema de expressão de mamífero. Preferencialmente, o referido ratinho transgénico foi concebido para ter uma capacidade reduzida para produzir anticorpos endógenos que incluem cadeias leves.

De preferência, os loci de cadeia pesada da imunoglobulina endógena ao rato são excluídos ou silenciados.

De preferência, o lócus da cadeia pesada V_H comprehende mais do que um segmento de gene V, mais do que um segmento do gene D e mais do que um segmento do gene J.

De preferência, a segmento do gene V foi escolhida para demonstrar as características melhoradas de solubilidade.

A região constante da cadeia pesada do lócus da cadeia pesada pode incluir um gene da região constante da cadeia pesada $C\alpha_1$ e/ou um $C\alpha_2$, um $C\epsilon$, um $C\delta$, um $C\gamma$ e/ou $C\mu$. Além disso, a região constante da cadeia pesada do lócus da cadeia pesada pode compreender mais do que uma das seguintes regiões constantes da cadeia pesada: $C\alpha_1$, $C\alpha_2$, $C\epsilon$, $C\delta$, $C\gamma$ $C\mu$.

O lócus da cadeia pesada V_H comprehende uma região variável que comprehende pelo menos um segmento do gene V humano, pelo menos, um segmento D humano e, pelo menos, um segmento J humano, em que um segmento do gene V, D e J são capazes de recombinar para formar uma sequência de codificação de VDJ. O lócus da cadeia pesada comprehende, preferivelmente, vinte ou mais segmentos do gene D e/ou cinco ou mais segmentos do gene J. O anel CDR3 é derivado a partir de segmentos de genes D e J humanos.

O lócus de cadeia pesada V_H pode também comprehender uma sequência de recombinação (rss) capaz de recombinar um segmento do gene J diretamente com um gene da região constante da cadeia pesada.

A região constante da cadeia pesada do lócus de cadeia pesada heteróloga é de origem humana ou de origem de animal vertebrado, por exemplo de origem de camelídeos. Em alternativa, a região constante pode não ser de cadeia pesada de imunoglobulina de origem.

O método da invenção resulta na maturação de células B essencialmente normais. O domínio de ligação V_H pode não ter um anel CDR3 estendido semelhante ao dos camelídeos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os presentes inventores conseguiram ultrapassar as limitações da técnica anterior e mostraram que ratinhos transgénicos podem ser gerados utilizando "micro loci" para produzir anticorpos apenas de cadeia pesada específicos para a classe, ou uma mistura de diferentes classes de anticorpos apenas de cadeia pesada que são segregados por plasma ou por células B. Estas podem então ser utilizadas como uma fonte de domínios de ligação V_H funcionais apenas de cadeia pesada, que são livres de funções efectoras, mas que retêm a função de ligação.

Os domínios V_H que podem ser gerados pelo método da invenção mostram afinidade de ligação elevada, resultante de rearranjos do segmento do gene V, D e J e mutações somáticas, geralmente na ausência de um ciclo de CDR3 aumentado. Essencialmente, a maturação de células B normais observa-se com níveis elevados de anticorpos apenas de cadeia pesada presentes no plasma isolado (desde que o domínio C_{H1} tenha sido eliminado em todas as classes de anticorpos presentes no lócus recombinante). A maturação de células B e a secreção de dímeros montados (por exemplo, IgG), ou multímeros (por exemplo, IgM) não tem nenhuma dependência em relação à presença ou expressão de genes de cadeia leve.

A análise da sequência de nucleótidos do mARN específico para o抗原 que codifica para uma cadeia pesada específica para o抗原 isolado a partir de hibridomas derivados de ratinhos transgénicos demonstrou que a diversidade de anticorpos de cadeia pesada é essencialmente uma função da recombinação de VDJ. Além disso, os presentes inventores demonstraram que a diversidade de anticorpos é gerada na região CDR3 do domínio de ligação ao抗原 funcional do anticorpo apenas de cadeia pesada, com uma contribuição mais limitado de mutações somáticas nos domínios V_H . Usando os métodos aqui descritos, domínios V_H funcionais podem ser clonados e expressos em sistemas bacterianos para gerar domínios de ligação V_H com retenção completa de ligação ao抗原, especificidade e afinidade.

Mostra-se que ratinhos transgénicos que podem ser programados para produzir as classes preferidas de anticorpos apenas de cadeia pesada em resposta ao desafio do抗原, por exemplo, apenas de IgG contra apenas IgM ou, por exemplo, misturas de IgA, IgG e IgM.

Os inventores descreveram anteriormente (ver WO02/085945 e WO02/085944) a geração de ratinhos transgénicos que expressam um lócus de região constante de cadeia pesada mínimo de IgG humana desprovido do exão C_H1 e ligados por segmentos D e J humano com dois genes de VHH de lama. Estes produzem anticorpos apenas de cadeia pesada funcionais, de alta afinidade, específicos para o抗原 IgG quando desafiados com抗原. Misturas de classes de anticorpos apenas de cadeia pesada única (IgM e IgG) podem ser

obtidas por troca de classe *in vivo*, através da utilização de construções de genes que incorporam as regiões constantes da cadeia pesada em tandem (desde que a todos os genes da região constante falte o domínio C_H1, quando presente, um domínio C_H4).

Os aperfeiçoamentos aqui descritos mostram que um rato construído com o mesmo lócus da região constante IgG ligada por segmentos D e J humanos com dois genes V_{HH} de lama e um lócus de região constante de IgM humana desprovido de um exão C_H1 ligados pelos mesmos segmentos de genes D e J humanos com dois segmentos de genes V_{HH} de lama, também produz anticorpo apenas de cadeia pesada IgM de elevado peso molecular (multimérico) e anticorpo apenas de cadeia pesada IgG (dímero). Surpreendentemente, a maturação das células B essencialmente normais e a produção de anticorpos está dependente da ausência total de sequências C_H1 a partir de cada região constante da cadeia pesada presente no lócus transgénico. Além disso, não existe qualquer requisito para a remoção do exão C_H4, se presente.

Assim, por exemplo, um animal transgénico transportando um lócus de cadeia pesada de IgM humana com um exão C_H1 funcional ligado pelos mesmos segmentos do gene D humano segmentos de gene J para dois segmentos do gene V do lama, e o lócus da região constante de cadeia pesada IgG desprovida do exão C_H1 ligado pelos mesmos segmentos do gene D e J humanos para dois segmentos de genes V do lama, produzem níveis muito baixos de anticorpos apenas de cadeia pesada e não mostram nenhuma evidência para a maturação de células B.

Outros domínios efectores, incluindo o domínio C_H4, podem ser incorporados ou não, como desejado, para introduzir ou eliminar características efectoras a partir do anticorpo apenas de cadeia pesada resultante.

Os inventores descobriram que a expressão de anticorpo produtivo (isto é, a maturação das células B), pode resultar da utilização de qualquer gene segmento V presente na construção. Isolamento e sequenciação do anticorpo de mRNA derivado a partir de células B mostra que a recombinação dos segmentos dos genes D e J ocorre para gerar a diversidade de CDR3. A comparação das sequências dos domínios V_H resultantes revela mutações somáticas, indicando que os eventos de maturação de afinidade têm ocorrido nos segmentos de genes D e J recombinados e também no domínio V_H do anticorpo de mRNA expresso resultante.

Construções preferidas incorporam segmentos de genes V selecionados para uma melhor solubilidade e ligados a um grupo de cadeia D e J para a recombinação e geração de CDR3. De preferência, as sequências de VDJ estão ligadas ao domínio constante efector de escolha, em conjunto, cada desprovido de um exão C_H1.

Os domínios V_H resultantes não podem compreender um circuito CDR3 alargado semelhante ao dos camelídeos. Isto resulta num domínio V_H exibindo diversidade de CDR3 e maturação de afinidade operacionalmente ligado a uma região constante efectora. Esta última assegura a secreção funcional e, opcionalmente, a montagem do rato parental.

Estas observações têm implicações importantes para a derivação aperfeiçoada e simplificada de domínios V_H solúveis de alta afinidade, que incorporam a maturação da afinidade através da mutação somática. Os domínios V_H podem ser expressos por si só ou em sistemas bacterianos ou de outros microrganismos ou segregados por hibridomas ou células transfetadas em cultura. Os domínios V_H de origem humana têm uma variada gama de aplicações na área da saúde, como medicamentos, diagnósticos e reagentes, com aplicações agrícolas, ambientais e industriais paralelas.

Moléculas efectoras de cadeia pesada podem ser manipuladas para serem livres de domínios funcionais, por exemplo os domínios C_H4 do terminal carboxi, desde que a manipulação não afecte os mecanismos secretores impedindo a montagem da superfície da célula e, consequentemente, a maturação de células B. Os exões C_H1 isolados são excluídos do lócus heterólogo ou estão ausentes do lócus. As características adicionais, podem ser manipuladas no lócus, por exemplo, para melhorar a glicosilação ou adicionar funções.

De preferência, o lócus heterólogo, quando expresso, é capaz de formar moléculas funcionais IgA, IgE, IgG, IgD ou IgM ou isotipos dos mesmos. Classes de anticorpos individuais ou misturas de classes de anticorpos ou isotipos dos mesmos, podem também ser produzidas.

Por conseguinte, o lócus de cadeia pesada heterólogo é concebido para produzir classes preferidas ou misturas de

anticorpos apenas de cadeia pesada de acordo com a classe de anticorpos requerida, com a maturação das células B essencialmente normais. A utilização de segmentos do gene V D e J humano, que compreendem segmentos do gene V selecionado aleatoriamente, ou selecionado para solubilidade aumentada, irá produzir anticorpos apenas de cadeia pesada humanos funcionais.

Os anticorpos obtidos no processo da invenção têm a vantagem sobre os da técnica anterior na medida em que são substancialmente de qualquer classe única ou conhecida de origem humana. Os anticorpos são de alta afinidade, resultante de uma combinação da recombinação de VDJ e maturação de afinidade *in vivo*. Os fragmentos dos mesmos podem ser isolados, caracterizados e fabricadas utilizando métodos bem estabelecidos conhecidos dos peritos na técnica.

Lócus da cadeia pesada heterólogo

No contexto da presente invenção, o termo "heterólogo" designa uma sequência de nucleótidos ou um lócus, tal como aqui descrito, que não é endógeno ao mamífero em que está implantado.

Um "lócus de cadeia pesada V_H ", no contexto da presente invenção refere-se a um micro-lócus mínimo codificando um domínio V_H que compreende um ou mais segmentos do gene V, um ou mais segmentos do gene D e um ou mais segmentos do gene J, operacionalmente ligados a uma ou mais regiões efectoras de cadeia pesada (cada desprovida de um domínio

C_H 1). De preferência, a fonte principal de variabilidade do repertório de anticorpos é a região CDR3 formada pela seleção de segmentos de genes D e J pelas junções V-D e D-J.

A vantagem da presente invenção é que o repertório de anticorpos e a diversidade obtidas dos rearranjados das sequências de genes V_H podem ser maximizados através do uso de vários segmentos do gene D e J. A subsequente mutação somática é conseguida enquanto se usa um lócus mínimo (micro-lócus), sem a necessidade de um grande número de segmentos de genes V ou de loci de imunoglobulinas V_L e L_c (cadeia leve).

De preferência, o lócus da cadeia pesada V_H compreende de dois a cinco segmentos de gene V (2, 3, 4 ou 5).

Os segmentos de gene V são de origem humana, opcionalmente selecionados para melhorar a solubilidade.

De preferência, o lócus da cadeia pesada V_H compreende 2-40 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30 ou 40) ou mais dos segmentos do gene D (normalmente de 25 segmentos funcionais do gene D humano).

De preferência, o lócus da cadeia pesada V_H compreende de dois a vinte (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 ou

20) ou mais segmentos do gene J (normalmente 6 segmentos do gene J humano).

De preferência, o lócus da cadeia pesada V_H compreende dois ou mais segmentos de gene V humano, vinte e cinco segmentos do gene D humano funcionais e 6 segmentos de gene J humano.

O termo "segmento do gene V" abrange um segmento de gene V de ocorrência natural derivado de um ser humano, que foi opcionalmente selecionado para características melhoradas, tais como a solubilidade.

Os métodos preferidos para melhorar a solubilidade de um domínio V_H incorporam meios racionais, em oposição a somente aleatórios, e são exemplificados em Davies e Reichmann, (1996) Protein Eng., 9 (6), 531-537 e Riechmann e Muylldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38. A seleção natural também pode ocorrer *in vivo* por meio de maturação de afinidade e de incorporação de mutações favoráveis no gene V_H seguinte ao rearranjo de VDJ.

O segmento do gene V deve ser capaz de recombinação com um segmento do gene D, um segmento do gene J e uma região constante de cadeia pesada (efectora) (que pode compreender vários exões mas exclui um exão C_H1) de acordo com a presente invenção para gerar anticorpos apenas de cadeia pesada V_H em que o ácido nucleico é expresso.

Assim as sequências de codificação V_H podem ser derivadas a partir de uma fonte que ocorre naturalmente ou podem ser sintetizadas utilizando métodos familiares aos peritos na técnica.

Um "domínio V_H ", no contexto da presente invenção refere-se a um produto de expressão de um segmento do gene V quando recombinado com um segmento do gene D e um segmento do gene J, como definido acima. O domínio V_H , tal como aqui utilizado permanece em solução e é ativo num meio fisiológico, sem a necessidade de qualquer outro factor para a manter a solubilidade. De preferência, a capacidade do domínio V_H solúvel para ligar o抗ígeno tem sido melhorada pela recombinação VDJ e mutação somática. Não há nenhuma dependência em relação à presença ou ausência do ciclo CDR3 alargado peculiar para as espécies de camelídeos. O domínio V_H é capaz de se ligar ao抗ígeno como monómero e, quando combinado com as regiões constantes efectoras, pode ser produzido em formas monoespécificas, biespecíficas, multiespecíficas, bivalentes ou multivalentes, dependendo da escolha e da manipulação das moléculas efectoras utilizadas (por exemplo, IgG, IgA IgM, etc) ou de mecanismos alternativos de dimerização e multimerização. Qualquer probabilidade de se ligarem com um domínio V_L , quando expresso como parte de um complexo de anticorpo apenas de cadeia pesada solúvel foi eliminada pela remoção do exão C_H1 (ver Sitia et al., (1990) Cell, 60, 781-790). O domínio V_H sozinho também pode ser manipulado com diferentes domínios de proteínas para produzir proteínas de fusão para fins terapêuticos e de diagnóstico orientadas, por exemplo, com as toxinas, enzimas e agentes de imagem.

O lócus da cadeia pesada heteróloga compreende uma região de ADN que codifica uma região constante da cadeia pesada que proporcionam funções efectoras *in vivo* (por exemplo, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD ou isotipos dos mesmos).

Região constante da cadeia pesada

Operacionalmente, uma região constante de cadeia pesada é codificada por um segmento de gene que ocorre naturalmente ou manipulado que é capaz de recombinação com um segmento do gene V, um segmento do gene D e um segmento do gene J em células B. De preferência, a região constante da cadeia pesada é derivada a partir de um lócus de imunoglobulina.

Cada região constante da cadeia pesada compreende essencialmente, pelo menos, um gene da região constante de cadeia pesada, que é expresso sem um domínio C_H1 funcional de modo que a geração de anticorpos apenas de cadeia pesada possa ocorrer. Cada região constante da cadeia pesada, também pode compreender um ou mais exões da região constante da cadeia pesada adicionais, os quais são selecionados de entre o grupo consistindo de C δ , C γ_{1-4} , C μ , C ϵ e C α_{1-2} com a condição de que a constante de cadeia pesada adicional também não expressa um domínio C_H1 funcional. Os segmentos de genes da região constante da cadeia pesada são selecionados dependendo da classe preferida ou mistura de classes de anticorpos necessária. Opcionalmente, o lócus da cadeia pesada heteróloga é deficiente em C μ - e C δ -.

Por exemplo, moléculas de Ig da classe M são conhecidas por desempenharem um papel importante na ativação de macrófagos e na via do complemento. Devido à proximidade dos seus locais de ligação, IgM tem uma avidez elevada para patógenos, incluindo vírus. No entanto, a IgM também é conhecida por ser difícil para uso em técnicas rápidas de imunoensaio enquanto Ig da classe G pode ser prontamente utilizada nestas técnicas. Para estas utilizações, seria útil selecionar para a classe de anticorpo preferida, ou seja, IgG ou IgM.

A expressão de todo ou parte do lócus de cadeia pesada heteróloga Cy desprovido de C_H1 irá produzir opcionalmente alguns ou todos os isotipos de IgG, dependente dos isotipos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 presente no lócus de IgG heteróloga. Em alternativa, as cadeias pesadas podem conter genes C_E. A molécula de IgE resultante também pode ser utilizada em terapia.

Alternativamente, podem ser obtidas misturas selecionadas de anticorpos. Por exemplo, a IgA e IgM podem ser obtidas quando a região constante da cadeia pesada compreende um gene C_α e um gene C_μ.

De preferência, a região constante da cadeia pesada é de origem humana, em particular quando o anticorpo de cadeia pesada é para ser utilizada para aplicações terapêuticas em seres humanos. Quando os anticorpos de cadeia pesada são usados para fins de diagnóstico ou veterinário, a região constante da cadeia pesada é de preferência derivada

do organismo alvo, vertebrado ou mamífero ou sobre a qual o diagnóstico ou terapia veterinária vai ser executada.

Quando expressa, à região constante da cadeia pesada falta um domínio C_{H1} funcional. O exão C_{H1} e, opcionalmente, as regiões constantes $C\mu$ e $C\delta$, podem ser mutadas, eliminadas ou substituídas. De preferência, o exon C_{H1} é excluído. A presença, por exemplo, de IgM com um domínio C_H funcional inibe a maturação das células B e, por conseguinte, limita a expressão produtiva apenas da cadeia pesada de IgG (desprovido de C_{H1}) no mesmo lócus, tal como maturação das células-B é inibida.

O "exão da da região constante de cadeia pesada" (exão " C_H ") tal como aqui definido inclui as sequências de ocorrência natural de um vertebrado, mas especialmente exões C_H de mamíferos. Isto varia de um modo específico de classes. Por exemplo, IgG e IgA são naturalmente desprovidas de um domínio C_{H4} . O termo "exão C_H " também inclui dentro do seu âmbito, os derivados, homólogos e fragmentos dos mesmos, na medida em que o exão C_H é capaz de formar um anticorpo apenas de cadeia pesada funcional, tal como aqui definido quando é um componente de uma região constante de cadeia pesada.

Opcionalmente, quando presente, o C_H 4ou outros domínios funcionais talvez manipulados ou suprimidos dentro do transgene fornecem um tal processo que não inibe o processo de secreção intracelular, a maturação de células B ou a

atividade de ligação a anticorpo do polipeptídeo resultante.

Ratos

De preferência, os ratos transgénicos são gerados utilizando a tecnologia de injeção de oócito estabelecida e, quando estabelecida, a tecnologia de células ES ou clonagem.

De um modo vantajoso, o loci endógeno de cadeia pesada de imunoglobulina e, opcionalmente, de cadeia leve, para o rato são eliminados ou silenciados quando um anticorpo apenas de cadeia pesada é expresso de acordo com os métodos da invenção.

Esta abordagem da produção de anticorpos apenas de cadeia pesada, como descrito acima, pode ser, talvez, de utilização particular na produção de anticorpos para utilização terapêutica em seres humanos, como muitas vezes na administração de anticorpos a uma espécie de vertebrados, que é de origem diferente da fonte dos anticorpos resultantes no aparecimento de uma resposta imunitária contra os anticorpos administrados.

O ratinho transgénico pode ser concebido para ter uma capacidade reduzida de produzir anticorpos que incluem cadeias leves.

As células produtoras de anticorpos podem ser derivadas a partir de ratinhos transgénicos de acordo com a presente invenção e utilizadas, por exemplo, na preparação de hibridomas para a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada, tal como aqui definido. Em adição ou alternativamente, sequências de ácidos nucleicos podem ser isoladas a partir de ratinhos transgénicos de acordo com a presente invenção e utilizados para produzir anticorpos apenas de cadeia pesada do domínio V_H ou complexos biespecíficos/bi-funcionais do mesmo, utilizando técnicas de ADN recombinante, que estão familiarizadas para os peritos na técnica.

Anticorpos apenas de cadeia pesada e seus fragmentos

O domínio de ligação apenas de cadeia pesada específico do抗原, ou seja, um domínio de ligação V_H , é expresso pelo lócus V_H como resultado da recombinação entre segmentos do gene V, D e J únicos, seguido posteriormente por mutação somática. De acordo com a invenção, o loci V_H pode ser clonado a partir de, por exemplo, o mARN isolado a partir de uma célula produtora de anticorpos de um ratinho transgénico imunizado tal como descrito acima. Sequências clonadas podem, em seguida, ser exibidas usando um fago (Ward et al., (1989) Nature, 341, 544-546) ou bibliotecas de exibição semelhantes, por exemplo, utilizando sistemas à base de levedura (Boder e Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15, 553-7) e domínios de ligação V_H específicos para o抗原 identificado. Os domínios de ligação de cadeia pesada específicos do抗原 podem então ser fabricados isoladamente ou como proteínas de fusão em sistemas de expressão escalável alternativos bacterianos, ou de levedura. As sequências que codificam domínios de ligação V_H também podem ser clonadas a partir

de hibridomas caracterizados derivados por métodos clássicos a partir de ratinhos transgénicos imunizados. Estes podem, então, ser utilizados para a produção de domínios de ligação V_H e derivados dos mesmos incluindo classes de anticorpos manipuladas ou definidas (por exemplo, IgE, ou IgA) e as suas variantes com diferentes funções efectoras.

Onde o domínio de ligação V_H é isolado a partir de um hibridoma caracterizado, a sequência do domínio de ligação V_H clonada derivada de mARN pode ser diretamente clonada num vector de expressão sem recorrer a medidas adicionais de seleção usando fagos e outros sistemas de visualização.

Os métodos adequados para a produção de domínios de ligação V_H por si só são conhecidos na técnica. Por exemplo, domínios de ligação V_H de camelídeos têm sido produzidos em sistemas bacterianos e homodímeros apenas de cadeia pesada de camelídeos têm sido produzidos em hibridomas e células de mamífero transfetadas (ver Reichmann e Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38).

Métodos também estão bem estabelecidos para a expressão de domínios de ligação V_H humanos manipulados derivados usando tecnologia de exibição de fagos (Tanha et al., (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780) e referências nele contidas.

Larvas de insectos a partir de linhas de moscas transgénicas têm sido mostradas produzir fragmentos funcionais de anticorpos apenas de cadeia pesada na hemolinfa com características indistinguíveis do mesmo anticorpo produzido por células de mamíferos (PCT/GB2003/0003319). Domínios de ligação V_H solúveis específicos do抗ígeno produzidos pelo método da invenção podem ser utilizados como um reagente de ligação intracelular, ou uma aczima.

Domínios de ligação V_H solúveis específicos do抗ígeno produzidos pelo método da invenção podem ser utilizados como um inibidor de enzima ou um bloqueador do receptor.

Um domínio AV_H fundido com uma molécula efectora pode ser utilizado como um agente terapêutico, de imagem, de diagnóstico, aczima ou reagente.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1: mostra a estratégia para a geração de ratinhos transgénicos que expressam um lócus de IgG e a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada funcionais e os domínios VH como um resultado do desafio com抗ígeno.

Figura 2: mostra a estratégia para a geração de ratinhos transgénicos que expressam um lócus de IgM e a geração de anticorpos apenas de cadeia pesada funcionais e os domínios VH como um resultado do desafio com抗ígeno.

Figura 3: mostra a estratégia para a geração de ratinhos transgénicos que expressam um lócus de IgA e a geração de anticorpos apenas de cadeia pesada funcionais e os domínios VH como um resultado do desafio com antígeno.

Figura 4: alinhamento da sequência dos produtos de PCR obtidos a partir de cADN de medula óssea utilizando iniciadores $V_{HH}1$ e $V_{HH}2$ em combinação com o iniciador $C\gamma 2$ humano a partir de ratinhos contendo um lócus com regiões constantes que têm uma mutação de camelídeos para remover CH1. Os resultados mostram que o CH1 não é removido.

Figuras 5-8: Estrutura de construções VH/VH de camelídeos (VHE). 1-n significa um número de genes de VH, ou segmentos D ou J. O complemento normal do lócus humano é de 51 genes V, 25 segmentos D funcionais (mais 2 não funcionais) e 6 segmentos J. No caso de uma região $C\mu$ (para IgM) ou $C\epsilon$ (para IgE) não existe região H e existe um exão CH4 adicional entre CH3 e M1. Os genes VH (s) têm sido mutados para fornecer solubilidade, tal como descrito no domínio público. Os genes VH, os segmentos D e J e os exões de C são, de preferência humanos, mas podem ser de qualquer outra espécie, incluindo camelídeos. Neste último caso, os genes VH de camelídeos (VHH) não são mutados porque são naturalmente solúveis.

Figura 9: calendário de imunização do rato e pesquisa de anticorpo para a geração de IgG apenas de cadeia pesada contra *E.coli* HSP70.

Figura 10: análise de resultados de citometria de fluxo e imunohistoquímica para células do baço derivadas de ratos transgénicos.

Figura 11: Resultados da análise de ELISA de ratos transgénicos DKTP imunizados e análise da sequência da biblioteca de anticorpos resultante.

Figura 12: Exemplos de mutações somáticas e rearranjo VDJ visto em ratinhos transgénicos imunizados.

Figura 13: Resultados do ensaio de coloração imunológica em linha de células Tet transfetadas com o plasmídeo de resposta contendo o anticorpo A5.

Figura 14: Resultados da análise Estern blot de soros de linhas de ratos transgénicos.

Figura 15: Tamanho do fracionamento de IgM humano misturado com uma única cadeia IgM humana produzida pelo lócus de IgM mais IgG de ratos.

Figura 16: Resultados da análise por ELISA de anticorpos IgG e IgM de cadeia simples produzidos contra o TNF α humano.

Técnicas Gerais

A menos que definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um vulgar perito na técnica (por exemplo, em cultura de células, genética molecular, química dos ácidos nucleicos, técnicas de hibridação e bioquímica). São utilizadas técnicas padrão para métodos moleculares, genéticos e bioquímicos (ver geralmente, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y . e Ausubel et al. Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4a ed., John Wiley & Sons,

Inc.) e métodos químicos. Além disso, Harlow & Lane, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y., é referido para técnicas imunológicas convencionais.

Qualquer técnica de ADN recombinante adequada pode ser utilizada no método da presente invenção. Os vectores de expressão típicos, tais como plasmídeos, são construídos compreendendo sequências de ADN que codificam para cada uma das cadeias do complexo de polipeptídeo ou anticorpo. Podem ser utilizados quaisquer técnicas estabelecidas adequadas para fragmentação enzimática e química de imunoglobulinas e de separação dos fragmentos resultantes.

Os vectores de expressão adequados que podem ser utilizados para clonagem em sistemas bacterianos incluem plasmídeos, tais como Col E1, pCR1, pBR322, pACYC 184 e RP4, ADN de fago ou derivados de qualquer um destes.

Para utilização na clonagem em sistemas de levedura, os vectores de expressão adequados incluem plasmídeos baseados numa origem de 2 micra.

Qualquer plasmídeo contendo uma sequência promotora do gene de mamífero adequado pode ser usado na clonagem em sistemas de mamíferos. As sequências promotoras de insectos ou bacculovirais podem ser usadas para a expressão de genes em células de insectos. Tais vectores incluem plasmídeos derivados de, por exemplo, pBR322, vírus do papiloma bovino, retrovírus, vírus de ADN e vírus vaccinia.

As células hospedeiras adequadas que podem ser utilizadas para a expressão do complexo de polipeptídeo ou de anticorpo incluem bactérias, leveduras e células eucarióticas, tais como as linhas de células de insectos ou de mamíferos, plantas transgénicas, insectos, mamíferos e outros sistemas de expressão de invertebrados ou vertebrados.

Exemplo 1

Em experiências preliminares, ratinhos transgénicos foram preparados para expressar um lócus de cadeia pesada, em que dois exons V_{HH} de lama foram ligados à diversidade de cadeia pesada humana (D) e juntos aos segmentos (J), seguido pelos genes da região constante humana $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma 2$, $C\gamma 3$ e imunoglobulina de cadeia pesada humana 3'LCR. Os genes humanos $C\gamma 3$ $C\gamma 2$ contêm uma mutação de splicing G para A. A presença do sítio Frt possibilitou a geração de uma única cópia de rato transgênico de uma matriz transgénica multi-cópia por recombinação Flp mediada. No entanto, as sequências do lócus transgénicos com uma mutação splicing de G para A tala, mostraram splicing aberrante mas remoção incompleta de CH1 (Figura 4).

Construções

Para ultrapassar este problema, uma biblioteca genómica de cosmídeos foi pesquisada quanto a clones que contenham os genes VH, utilizando métodos convencionais. Uma (ou mais) linha germinativa VHS diferente foi escolhida aleatoriamente com base na sua sequência (cinco classes de géneros, no caso dos VH's humanos). Códãos de aminoácidos hidrofílicos foram introduzidos nas posições 42, 49, 50 e

52 de acordo com a numeração IMGT (Lefranc et al. (1999)). Os genes VH foram combinados num vector BAC por procedimentos padrão, tais como clonagem direta à medida usando ligantes ou recombinação homóloga.

Dois clones foram selecionados a partir da biblioteca genómica humana Pac RPCI-11 (BACPAC resource Center, EUA): clone 1065 N8 contendo segmentos D e J de cadeia pesada humana, C μ (IgM) e C δ (IGD) e clone 1115 N15 contendo genes C γ 3 (IgG3). Clone Bac 11771 a partir de uma biblioteca genómica humana diferente (Incyte Genomics, CA, EUA) foi usado como uma fonte do gene C γ 2 (IgG2) e de imunoglobulina de cadeia pesada LCR (Mills et al (1997) J. Exp Med, 15; 186 (6):845-58).

Usando técnicas padrão, os genes C γ 3 e C γ 2 foram subclonados separadamente no vector pFastBac (Invitrogen). Do mesmo modo qualquer uma das outras regiões constantes de Ig pode ser clonada a partir destes BACs (IgA, IgE). Uma supressão completa do exão CH1 foi realizada por recombinação homóloga (Imam et al. (2001)), usando as sequências que flanqueiam o exão CH1 de cada região constante. Um local DRF pode opcionalmente ser introduzida na frente da região de troca de C μ para permitir a geração de uma única cópia do lócus a partir de multicópia do lócus por tratamento com recombinase de flp em vivo por meios convencionais, por exemplo por meio de cruzamento de ratinhos rosa-flp (Figura 5).

Os genes VH separados, os segmentos D e J e exões C e LCR foram clonados num BAC, quer por digestão de restrição convencional e ligações ou por recombinação homóloga (ou uma mistura de ambos), ou qualquer outra técnica de clonagem.

Outras construções poderiam então ser criadas.

Lócus apenas de IgM

A fim de obter a construção de IgM (Figura 6), um ou mais genes de VHS, seguido por segmentos da cadeia pesada D e J humana e C μ , foram clonados num BAC. Para a metodologia veja acima. Neste caso, apenas a região do C μ foi clonada no BAC final.

IgM mais lócus de IgG, (C δ é opcional)

A fim de se obter a construção de IgM mais IgG (Figura 7), um ou mais genes de VHS, seguido por segmentos de cadeia pesada D e J humana, C μ (sem CH1 mas com o exão CH4), (C δ opcional) e os genes C γ 2 e C γ 3 humanos modificados e 3'LCR foram clonados no BAC. A fim de gerar um único lócus IgG locais loxP foram introduzidos durante os passos de clonagem padrão (descrito acima) e o BAC é crescido em 294 Cre da estirpe de E. coli (Buscholz et al.) e produz bactérias por recombinação cre mediada produzindo um único lócus de IgG. Para mais detalhes, consulte a construção acima.

Ratos transgênicos, crescimento e genotipagem

O BAC final foi introduzido em ratinhos transgênicos por microinjeção padrão de ovos fertilizados ou através da

tecnologia de transfecção de células estaminais embrionárias.

Loci transgénicos foram verificados quanto à integridade e número de cópias por Southern blot de ADN da cauda (Southern 1975), utilizando sondas da extremidade 5' e 3' do lócus. Fundadores foram criados como linhas no ambiente μ MT-/. A genotipagem foi realizada por análise de PCR padrão utilizando iniciadores para cada uma das diferentes regiões do lócus. A análise da sequência dos produtos de RT-PCR derivados de BM cADN de ratinhos transgénicos em que todo o exão CH1, tanto do Cy2 e do Cy3 foi excluído (um com (linhas HLL) e outra sem os genes C μ e C δ , mostrou que o loci transgénico não só são capazes de recombinação VDJ, mas que as transcrições de IgG se assemelham às encontradas nos HCabs do lama e camelo.

Imunohistoquímica

Os baços foram embebidos em composto PTU. Secções de 5 μ m criostáticas congeladas foram fixadas em acetona e marcadas simples ou duplas, tal como descrito anteriormente (Leenen et al. 1998). Os anticorpos monoclonais anti-B220/RA3-6B2, anti-CD11c/N418 (Steinman et al., 1997), foram aplicados como sobrenadantes de cultura de hibridomas. Peroxidase de cabra anti-humano acoplado a IgG e IgM anti-humana eram da Sigma. Os reagentes da segunda etapa foram marcados com peroxidase de cabra Ig de anti-rato (DAKO, Glostrup, Dinamarca) ou Ig de anti-hamster (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) e Ig de cabra anti-rato com fosfatase alcalina (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, EUA).

A Figura 10 mostra a análise imunohistoquímica de cortes de 5 μ m de baços congelados de μ MT^{-/-}, WT e HLL e de ratos transgénicos camundongos HLL-MD no ambiente μ MT^{-/-}. Os cortes foram corados com anti B220 (azul) para as células B e anti-CD11c/N418 (castanho) para as células dendríticas. As setas indicam a localização de pequenos aglomerados de células B.

Análises de citometria de fluxo

As suspensões de células isoladas foram preparadas a partir de órgãos linfóides em PBS, como descrito anteriormente (Slieker et al. 1993). Aproximadamente 1×10^6 células foram incubadas com anticorpos em PBS/0,5% de albumina sérica bovina (BSA) em placas de 96 poços durante 30 min a 4°C. As células foram lavadas duas vezes em PBS/BSA a 0,5%. Para cada amostra, 3×10^4 eventos foram registados com um analisador FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Os dados FACS foram analisados usando o software CellQuest versão 1.0. A análise de quatro cores foi realizada num Calibur Becton Dickinson FACS. Os seguintes mAbs foram obtidos a partir de BD Pharmingen (San Diego, CA): FITC conjugado com anti-B220 RA3-6B2, PE conjugado com anti CD 19. Os dados FACS de digitalização de células do baço, coradas com anti-CD19 e anti-B220 são apresentados no painel inferior da Figura 10.

No lado esquerdo da figura está uma representação da recombinação Flp *in vivo* por meio de cruzamento de linhas da HLL para uma linha transgénica FlpeR e apoando os dados FACS digitalizados sobre as células do baço do recombinante, mostrando o resgate de células B como pode

ser visto nas linhas originais HLL-MD geradas diretamente. À direita está uma representação da recombinação Cre *in vivo* por meio de cruzamento de linhagem transgénica Cag Cre e dados FACS em células do baço do recombinante de cópia única.

Imunização e produção de hibridomas (Figura 9)

Foram criados ratos transgénicos contendo um lócus de anticorpo apenas de cadeia pesada consiste em dois domínios VHH de lama, regiões D e J humanas e regiões constantes IgG2 e 3 (sem um domínio CH1). Os ratos com 8 semanas de idade foram imunizados tanto com a proteína de choque térmico de *E. coli* 70 (hsp70) como com 20 µg ou 5 µg de antígeno com adjuvante Specol (IDDO, Lelystadt, NL) que foi injetado respectivamente sc nos dias 0, 14, 28, 42 e ip no dia 50. A recolha de sangue foi feita no dia 0, 14 e 45. Depois de três reforços foi detectado um baixo título de anticorpos específicos do antigénio em 1 de 3 ratinhos HLL-MD1 imunizados com Hsp70 (Figura 9).

A fusão de células de baço normal com uma linha de células de mieloma foi realizada para gerar um anticorpo monoclonal resultando numa linha de células de hibridoma monoclonal contra a proteína hsp70. O anti-HSP-70 HCAB consiste no segmento VHH de lama mais próximo da região D (VHH 2) recombinada para o segmento IgHD3-10 humano (acc. num. X13972) e o segmento IgHJ4-02 humano (acc.num.X86355). Apesar de não ser em alta frequência, os VHHS têm algumas mutações que dão origem a alterações de aminoácidos observados na Figura 4, quando em comparação com a configuração da linha germinal. A análise por RT-PCR

mostrou também apenas uma transcrição de IgH produtiva no hibridoma, o que sugere que não há outras transcrições feitas. O anticorpo IgG2 α HSP70 é segregado como um dímero apenas de cadeia pesada (Western blot sob condições de gel de desnaturação (dímero) e gel não desnaturante (de monómeros) Figura 9). As células do baço foram fundidas com células de mieloma Sp2-O-Agl4 (presente de R. Haperen) no dia 56, utilizando um kit ClonalCellTM-HY (StemCell Technologies, UK) de acordo com as instruções do fabricante.

Ratos transgênicos contendo um lócus de anticorpo apenas de cadeia pesada que consiste em dois domínios VHH de lama, regiões D e J humanas, uma IgM humana e regiões constantes IgG2 e 3 (todos sem um domínio CH1, Figura 7) foram imunizados com TNF α para obter anticorpos HC-IgM. Um em cada três ratos mostrou soros positivos em testes ELISA padrão. Uma fusão de mieloma padrão originou um hibridoma IgM positivo (Figura 11). Após filtração em gel em Sepharose 6B em condições não-reduzidas cada fracção da coluna foi carregada para um gel sob condições redutoras e detectado por IgM-HRP α humana (Figura 15). O fraccionamento em condições não redutoras revelou que a HC-IgM é segregada como um anticorpo multimérica com o mesmo tamanho de uma IgM humana de controlo (após a subtração do peso molecular das cadeias leves e do domínio CH1 que estão ausentes da HC-IgM). O fraccionamento em gel de cada fracção da coluna sob condições redutoras mostrou o monómero esperado (Figura 15).

Soro Ig ELISA

Sangue de ratos com 15-25 semanas de idade foi recolhido em tubos de EDTA revestidos, centrifugado durante 15 'à temperatura ambiente (TA) e o sobrenadante diluído a 1:5 em PBS. Uma placa de 96 poços foi revestida durante 2 horas com 5 mg/ml de IgG de cabra anti-humano (SIM Biotechnology) ou IgM de cabra anti-humano (Sigma), lavado com PBS, bloqueado durante 1 hora à temperatura ambiente com solução de bloqueio (1,5% BSA/1,5 % de leite em pó/0,1% de Tween 20/PBS) e lavado três vezes com PBS. A Série de diluições de amostras de soro e os padrões (IgG2 humana ou IgM humana (Sigma, Zwijndrecht, NL)) foram carregados e incubados durante 2-4 horas e as placas foram lavadas seis vezes com PBS antes da adição de um anticorpo secundário (a 1:2000 de IgG DE cabra anti-humano diluída ou IgM DE cabra anti-humano conjugada com HRP (Sigma, Zwijndrecht, NL)). Todas as diluições foram realizadas numa solução de bloqueio. Após incubação 1-2 h à temperatura ambiente e lavagem em PBS, foi adicionado substrato POD (Roche).

O ELISA para a detecção de sdAbs solúveis específicos de抗igénios a partir da biblioteca de fagos de IgG2 é mostrado na Figura 11. SdAbs solúveis foram usados como anticorpos primários nas placas revestidas com抗igénio, seguido de anticorpo de rato α-myc e anticorpo conjugado com HRP de cabra α-rato. POD foi utilizado como um substrato. O painel inferior mostra as impressões digitais de clones com a enzima de restrição Hinf I, mostrando cinco inserções diferentes que codificam para sdAb contra *B.Pertusis*.

Construção da biblioteca de anticorpos e rastreio

ARN total foi isolado a partir do baço de ratos DKTP imunizados apenas com uma cópia única de IgG (Figura 7 após tratamento cre) utilizando o sistema de isolamento de ARN Ultraspec (Biotecx Laboratories Inc., Houston, Texas, EUA). cADN foi feito utilizando oligo dT. Os fragmentos de ADN que codificam fragmentos VHHDJ foram amplificados por PCR utilizando iniciadores específicos: iniciador vh1 volta Sfil (Dekker et al 2003), em combinação com iniciador hIgG2hingrev (5'-AATCTGGGCAGCGGCCGCTCGACACAAACATTGCGCTC-3'). Os VHHDJs amplificados (~ 400 pb) foram digeridos com Sfi I/Not I, purificados em gel e clonados em Sfil/NotI digerido com o vetor fagemidico pHEN-1.

A transformação em células electro-competentes TG1 resultou numa biblioteca de anticorpos de domínio único humano. Duas rondas de seleção foram realizadas utilizando garimpo em抗ígenos vacinais adsorvidos em plástico (imunotubos revestidos com vacina não diluída). A análise de restrição e sequenciamento foram padrão.

RT-PCR em lócus apenas de cadeia pesada

Foi então investigado se as funções de lócus HLL-MD como um lócus normal para produzir um repertório de anticorpos diversificado pelo sequenciamento dos produtos de RT PCR obtidos usando iniciadores específicos IgG2 e IgG3 em cADN de placas de Peyer. A Figura 12 mostra alguns exemplos de mutações somáticas de clones a partir de ratinhos não imunizados (painel esquerdo) e ratos imunizados (painel direito). Os ratinhos foram do loci de apenas IgG, imunizados com hsp70 de *E. coli*, lisado de Pertussis,

toxóide tetânico. Em tom de cinza é a região de dobradiça IgG2 começando com ERKCCV

Embora, a análise de RT-PCR em placas de Peyer mostre que ambos os VH são usados, todos os anticorpos sequenciaram o VH2 rearranjado. A fonte de variabilidade do repertório é a região CDR3 formada pela seleção de segmentos D e J e pelas junções V-D e D-J. A utilização de segmentos J humanos é semelhante à observada em rearranjos humanos, com os segmentos JH4 e JH6 sendo usados mais frequentemente.

Esta análise mostrou que ambos os VHS, os segmentos D humanos diferentes e todos os segmentos J humanos são utilizados para contribuir para um repertório de anticorpos diversificado. Também mostraram a presença de IgG3 de comutação de células B e a ocorrência de mutações somáticas por comparação de cada gene rearranjado com o seu homólogo da linha germinal, ou seja, o original VH na construção transgénica (ver Figura 12). Portanto, o receptor de抗igénio de IgG apenas de cadeia pesada humana pode fornecer os sinais necessários para a maturação de células B.

Imunocoloração

A Figura 13 mostra os resultados de imunocoloração de uma linha celular Tet adicionalmente transfectada com o plasmídeo de resposta contendo o anticorpo A5 (Dekker et al. 2003). O painel superior mostra a produção de anticorpos A5 induzida por doxiciclina (vermelho) no citoplasma e a coloração nuclear de células com DAPI

(azul). O painel inferior mostra que as células que expressam rtTA no núcleo são aqueles que produzem a A5 após indução (painel superior). A coloração foi feita com uma das HCAB humano contra rtTA (verde) com a sequência mostrada abaixo. O FITC conjugado com IgG de cabra anti-humana foi utilizado como um passo secundário. A5 foi detectado como descrito anteriormente por Dekker et al 2003. O anticorpo rtTA era uma IgG3 com a seguinte sequência:

241 AGACTCT

80 R L

301 CCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACGCCAGGCTC

100 S C A A S G S I F S I N A M G W Y R Q A

361 CAGGGAAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGCTATTACTAGTGGTGGTAGCACAGGTATGCAG

120 P G K Q R E L V A A I T S G G S T R Y A

421 ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGC

140 D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L

481 AAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTGATCTATGGITC

160 Q M N S L K P E D T A V Y Y C L I S M V

541 GGGGAGCCCGTTTGACTACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGAGCTCA

180 R G A R F D Y W G Q G T L V T V S S E L

601 AAACCCCCACTT

200 K T P L

A charneira de IgG3 começa no aminoácido 198 ELKTPL. Para comparação ver a região de charneira de IgG2 na Figura 12.

Análises de Western blot

Figura 14 mostra Western blot dos soros de diferentes linhas de ratos transgênicos contendo o lócus IgM mais IgG (Figura 5) após o tratamento cre (isto é suprimido IgM, apenas IgG à esquerda). Os soros foram purificados por prot G e fraccionados em gel sob condições redutoras (Figura 14 painel direito) e não redutoras (Figura 14, painel esquerdo). Os controlos foram o ambiente de ratos KO e uma amostra de soro humano normal. Note-se a diferença de tamanho entre os dois géis mostrando que a IgG humana apenas de cadeia pesada é um dímero.

O sinal mostrado na Figura 14 foi detectado com um anticorpo IgG anti-humano por procedimentos padrão.

Tamanho do fracionamento de IgM humano produzido pelo lócus de IgM mais IgG do rato

O soro dos ratinhos IgM mais IgG (Figura 8) foi fraccionado por filtração em gel sob condições não redutoras, após mistura com uma amostra de soro humano como um controlo. Os resultados são mostrados na Figura 15. Os pesos moleculares dos complexos sobre a diminuição da coluna com cada pista (representando cada fracção) da esquerda para a direita. As fracções (cada pista) foram analisadas por electroforese em gel em condições de redução.

A análise de ELISA foi realizada sobre um número de hibridomas feitos a partir de ratinhos contendo o lócus de IgM mais IgG (Figura 8) imunizados com TNF α humano. Os resultados são mostrados na Figura 16. As duas linhas superiores na Figura 16 foram analisadas com uma IgG anti-

humana, as próximas duas linhas com uma IgM anti-humana. As amostras de soro (setas) mostram que o rato gerou tanto anticorpos IgG como IgM anti-TNF α . A seta mostra um único hibridoma positivo IgM. Os poços foram revestidos com TNF α humano disponível comercialmente. Todos os procedimentos foram padrão.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um domínio de ligação V_H solúvel específico do抗原, que permanece em solução e é ativo num meio fisiológico, que compreende:

(a) a injeção de um抗原 num rato transgénico que expressa um lócus heterólogo de cadeia pesada V_H , em que:

(i) o lócus da cadeia pesada V_H compreende uma região variável que compreende pelo menos um segmento do gene V_H de ocorrência natural, pelo menos, um segmento do gene D, pelo menos um segmento do gene J e pelo menos uma região constante de cadeia pesada, e em que os segmentos do gene V, D e J são derivados a partir de um humano;

(ii) cada região constante não codifica um domínio funcional C_{H1} ;

(iii) um segmento do gene V, um segmento do gene D e um segmento do gene J são capazes de se recombinarem para formar uma sequência de codificação de VDJ;

(iv) o lócus de cadeia pesada V_H recombinado, quando expresso, é capaz de formar, um anticorpo apenas de cadeia pesada solúvel compreendendo um domínio de ligação V_H solúvel específico do抗原 e uma região efectora constante desprovida de um domínio funcional C_{H1} ;

e:

(b1) o isolamento de uma célula ou tecido que expressa, um anticorpo apenas de cadeia pesada específico do抗原 de interesse;

(c1) a produção de um hibridoma a partir da célula ou do tecido do passo (b1);

(d1) a identificação e isolamento de um domínio V_H específico de抗énio clonado a partir do mARN do passo (c1),
ou:
(b2) o isolamento de uma célula ou tecido que expressa, um anticorpo apenas de cadeia pesada específico do抗énio de interesse;
(c2) a clonagem da sequência que codifica o domínio V_H (s) a partir de mARN derivado a partir da célula ou tecido isolado;
(d2) exibição da proteína codificada usando um fago ou biblioteca similar;
(e2) a identificação específica do domínio V_H do抗énio; e
(f2) expressão do domínio V_H isoladamente ou como uma proteína de fusão em sistemas de expressão alternativos bacterianos ou de levedura.

2. Método da reivindicação 1, em que o sistema de expressão no passo (f2) é um sistema de expressão de mamífero.
3. Método da reivindicação 1 ou da reivindicação 2, em que o dito ratinho transgénico foi concebido para ter uma capacidade reduzida para produzir anticorpos endógenos que incluem cadeias leves.
4. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que os loci da imunoglobulina de cadeia pesada endógenos para o rato são eliminados ou silenciados.

5. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o locus V_H da cadeia pesada compreende mais do que um segmento do gene V , mais do que um segmento do gene D e mais do que um segmento do gene J .

FIG. 1

Generation of heavy chain only IgG

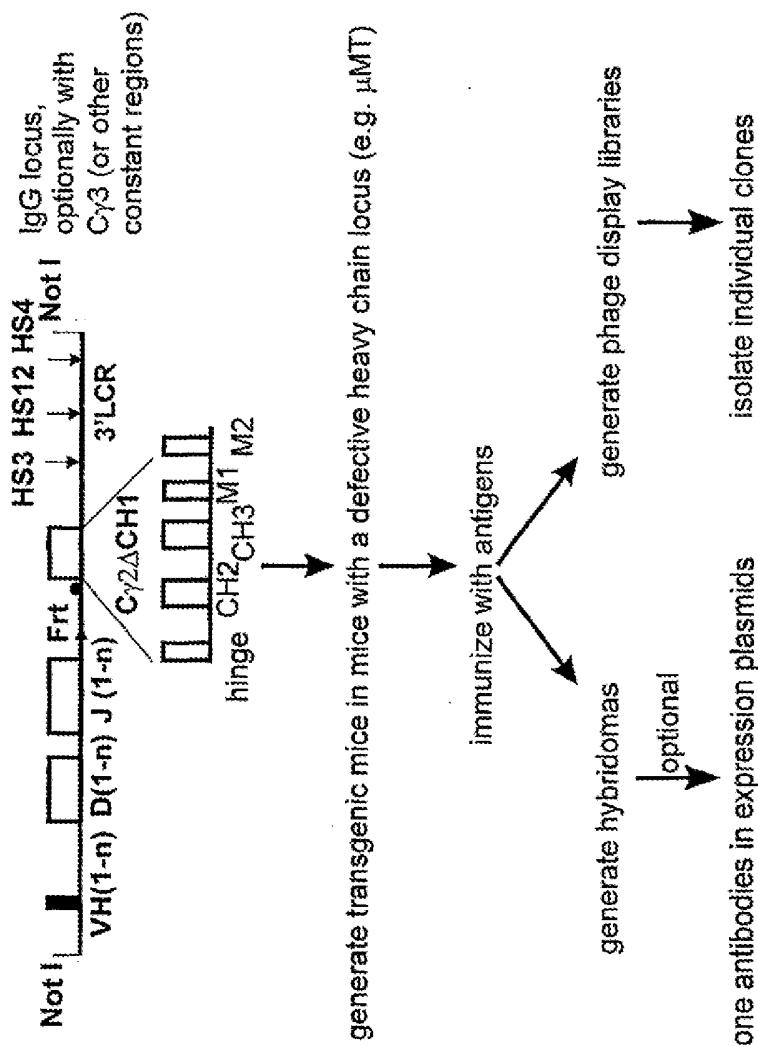


FIG. 2

Generation of heavy chain only IgM

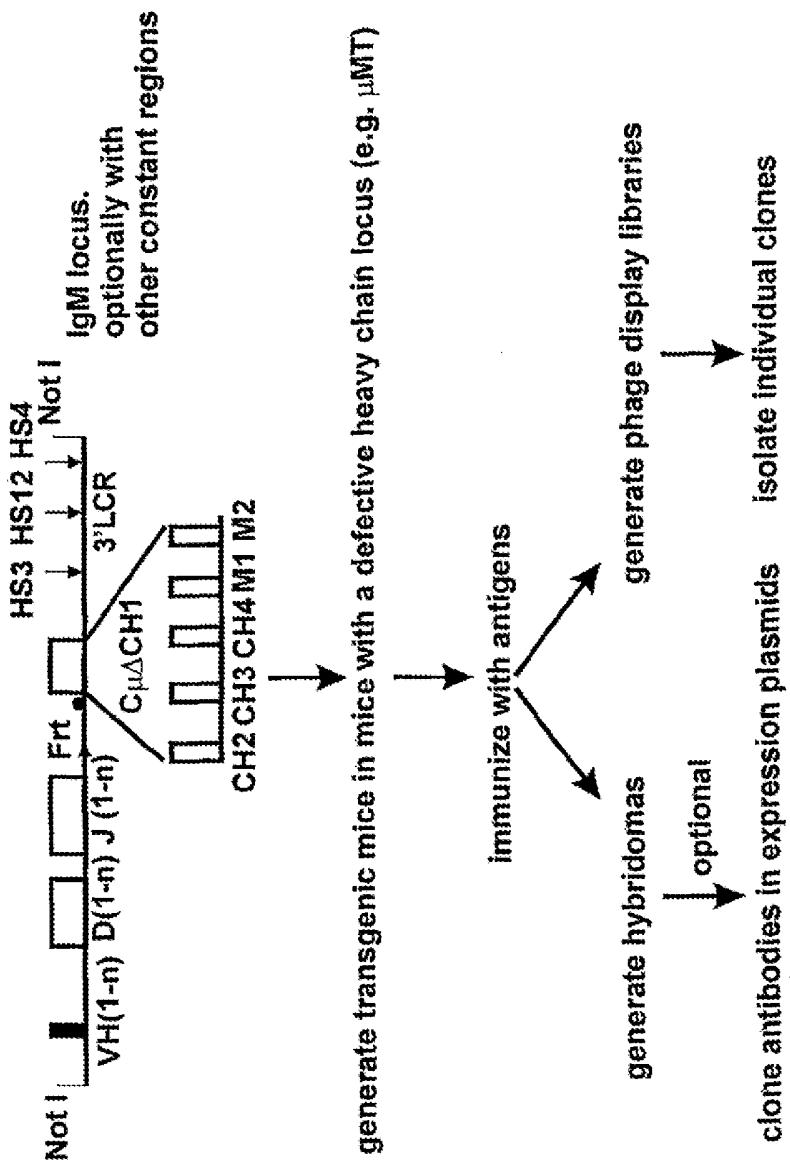


FIG. 3

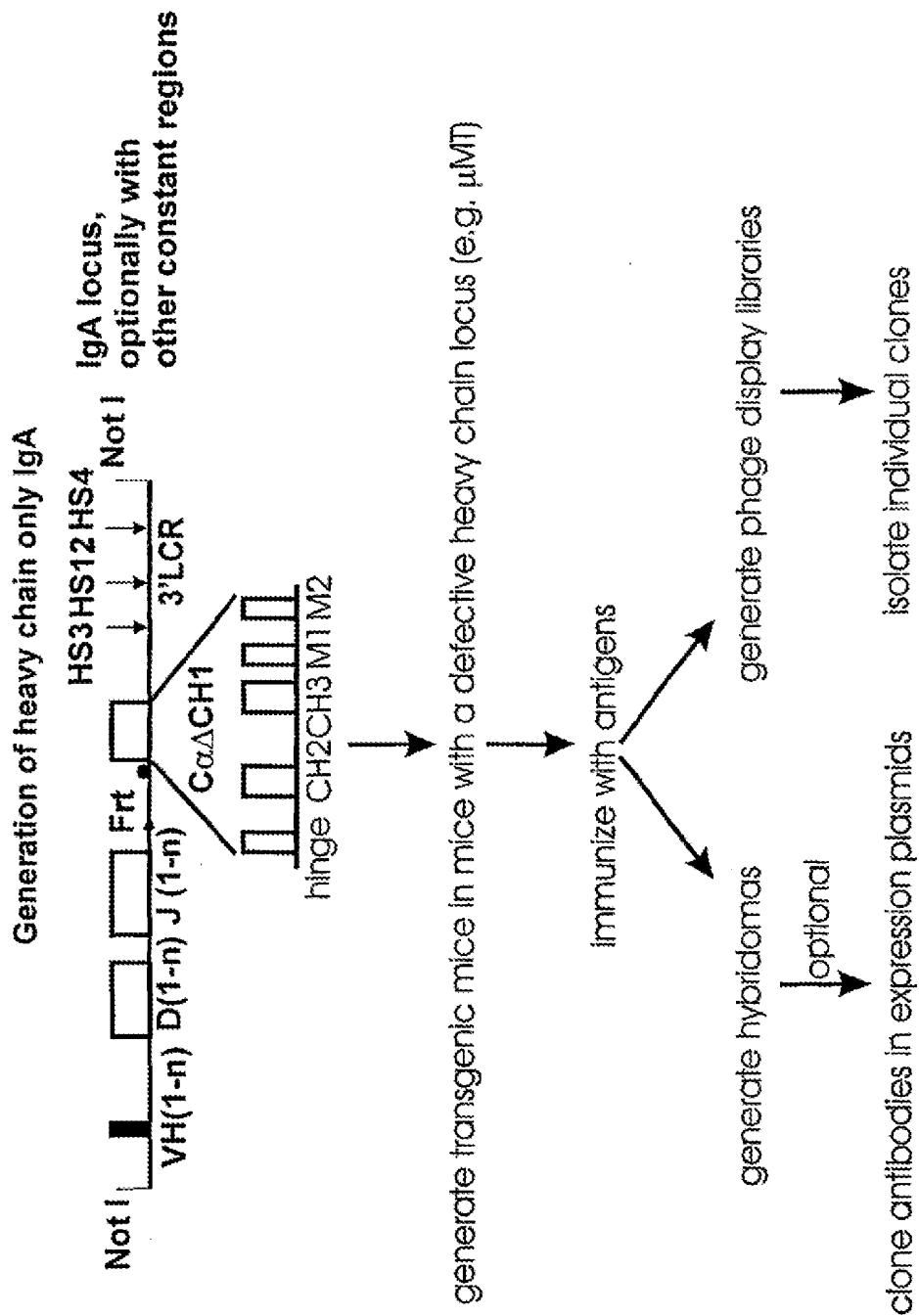


FIG. 4

	vH	D	J
VDJg*1	GACCGGGCCATGTAATATCTGTAAAGCAGATGG.....		CGTACTACTATGGTCG...GGGA.
VDJg*2	GAC.....		AATCCCBCTTCGATC...T...
VDJg*3	GACACGGCCGTCATATTACTGTAAATGCCACTACCG.....		ATATTTTGACTGGTTAT...TATA.
VDJg*4	GACACGGCCGTCATATTACTGTAAATGCCAGATGCACTATGTTACATGTTACCTACACTACGGTATG.		CTATGGTTACGTACITTT
VDJg*5			
	J	CH1	
VDJg*1	GTCACCACTGC33GTAGCAGGGCCAGGCAACACTGGTCGGCTGTGTCAAGCCTCCCGCAAGGGCCATCGTCCTCCC		
VDJg*2CTGGGGCCGCTGCTAACCTGGTCGGCTACCTCTCTTCAGCCTCCCGCAAGGGCCATCGTCCTCCC		
VDJg*3	GAC.....GCTACTGGGGCCAGGGCAACCTGGTCGGCTACCTCTTCAGCCTCCCGCAAGGGCCATCGTCCTCCC		
VDJg*4	GACTA.....CTGGGGCCAGGGCAACCTGGTCGGCTACCTCTTCAGCCTCCCGCAAGGGCCATCGTCCTCCC		
VDJg*5	GACCT.....CTGGGGCCATGGCAACCTGGTCGGCTACCTCTTCAGCCTCCCGCAAGGGCCATCGTCCTCCC		
	CH1		
VDJg*1	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCAGAGACCAAGCGGCCCTGGCTGGCTGCTAACGGACTACTTCCCCGAACCGG		
VDJg*2	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCAGAGACCAAGCGGCCCTGGCTGGCTGCTAACGGACTACTTCCCCGAACCGG		
VDJg*3	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCAGAGACCAAGCGGCCCTGGCTGGCTGCTAACGGACTACTTCCCCGAACCGG		
VDJg*4	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCAGAGACCAAGCGGCCCTGGCTGGCTGCTAACGGACTACTTCCCCGAACCGG		
VDJg*5	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCAGAGACCAAGCGGCCCTGGCTGGCTGGCTGCTAACGGACTACTTCCCCGAACCGG		
	CH1		
VDJg*1	TGACCGTGTCTGGAACTCAGGGCGTCTGACCAAGCGGCCCTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC		
VDJg*2	TGACCGTGTCTGGAACTCAGGGCGTCTGACCAAGCGGCCCTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC		
VDJg*3	TGACCGTGTCTGGAACTCAGGGCGTCTGACCAAGCGGCCCTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC		
VDJg*4	TGACCGTGTCTGGAACTCAGGGCGTCTGACCAAGCGGCCCTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC		
VDJg*5	TGACCGTGTCTGGAACTCAGGGCGTCTGACCAAGCGGCCCTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC		
	CH1		
VDJg*1	TCCCTCAGCAGCGGTGTCACCGCTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGGCCAG		
VDJg*2	TCCCTCAGCAGCGGTGTCACCGCTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGGCCAG		
VDJg*3	TCCCTCAGCAGCGGTGTCACCGCTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGGCCAG		
VDJg*4	TCCCTCAGCAGCGGTGTCACCGCTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGGCCAG		
VDJg*5	TCCCTCAGCAGCGGTGTCACCGCTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGGCCAG		
	CH1	Hinge	
VDJg*1	CAACACCAAGAGCCCAAATGTTGTGTCGAG		
VDJg*2	CAACACCAAGAGCCCAAATGTTGTGTCGAG		
VDJg*3	CAACACCAAGAGCCCAAATGTTGTGTCGAG		
VDJg*4	CAACACCAAGAGCCCAAATGTTGTGTCGAG		
VDJg*5	CAACACCAAGAGCCCAAATGTTGTGTCGAG		
		◆ GGTGGACAAGACAGTT	

FIG. 5

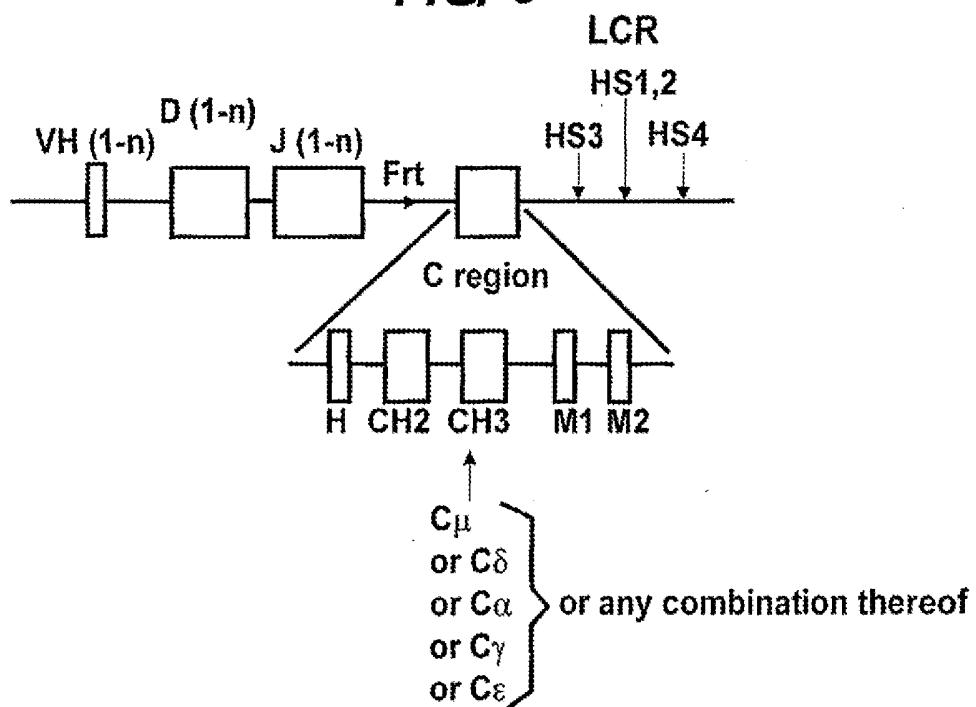


FIG. 6

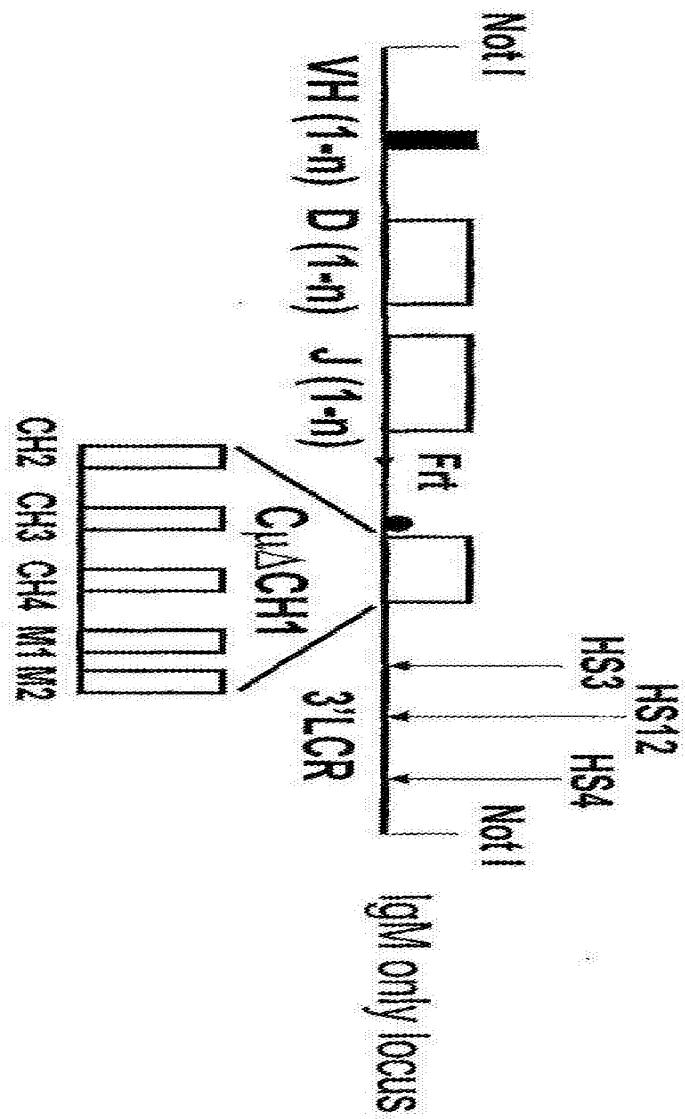
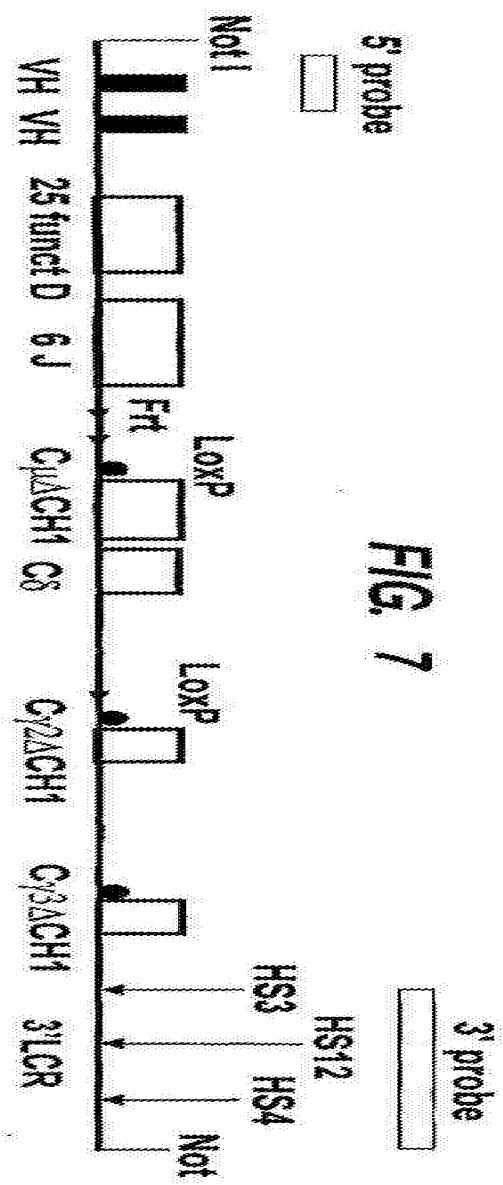
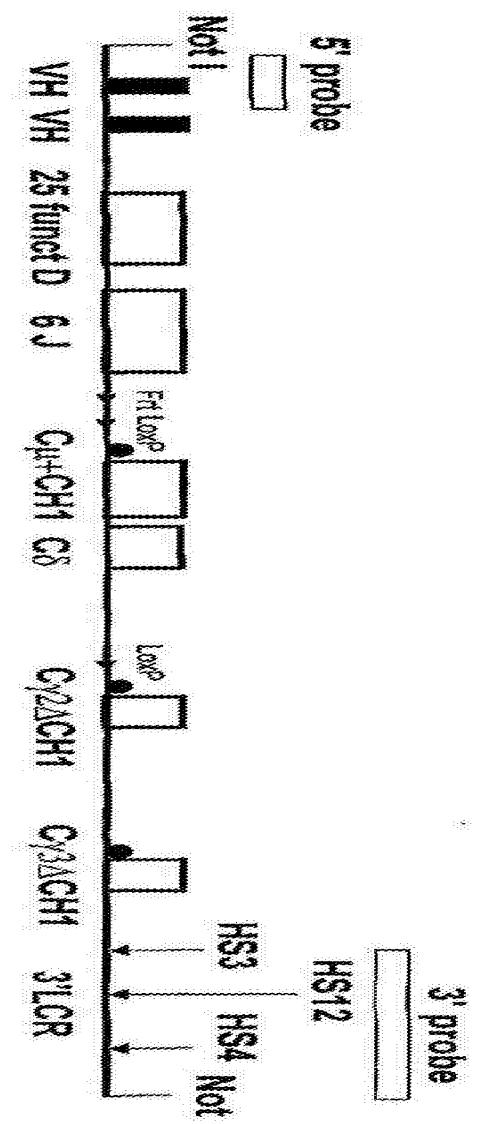


FIG. 7



IgM plus IgG locus, C8 is optional

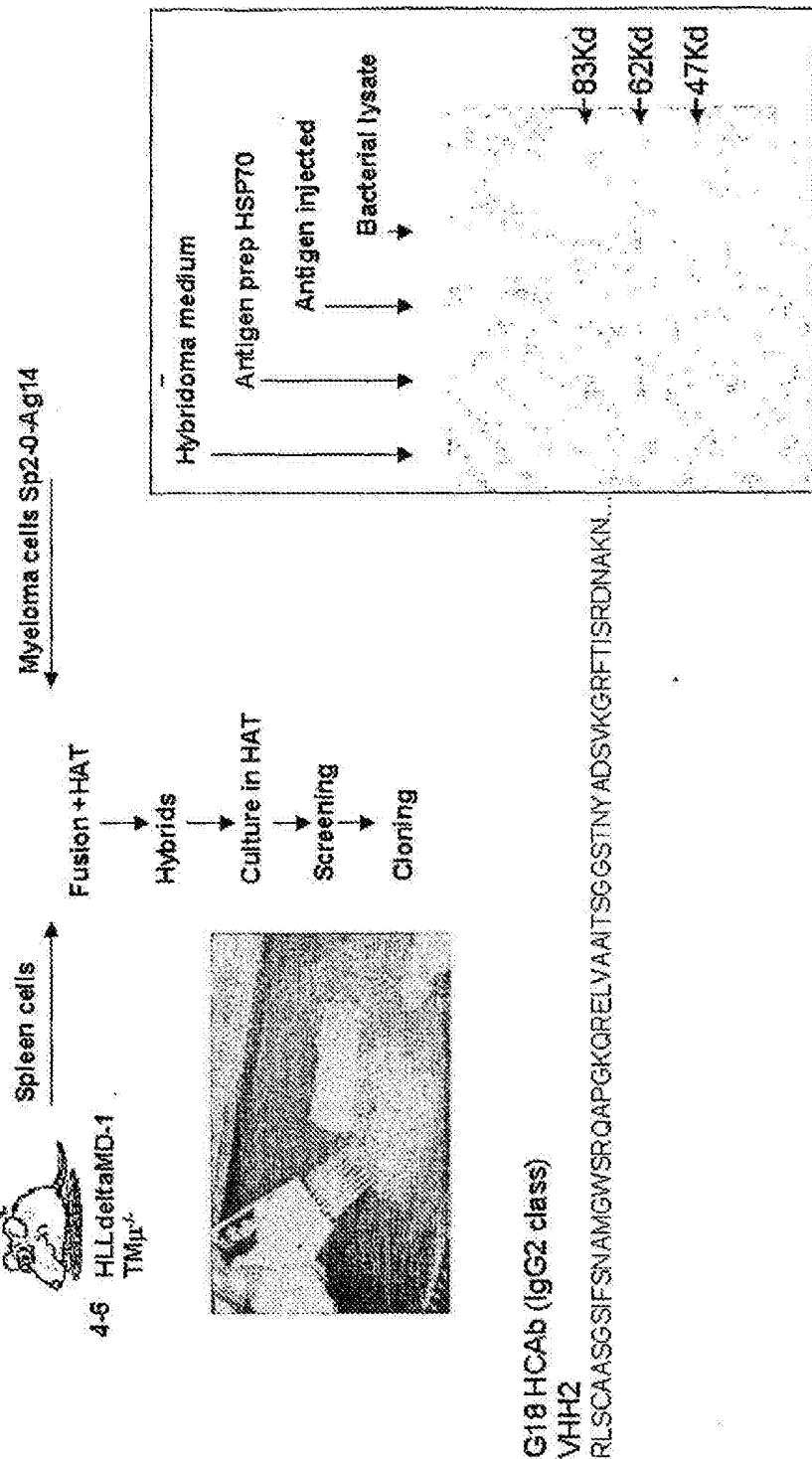
FIG. 8



IgM plus IgG locus, C_G is optional

IMMUNIZATION SCHEDULE
 s.c. injections at days 0, 14, 28, 42
 i.p. or i.v. injection at day 50
 day 56

FIG. 9



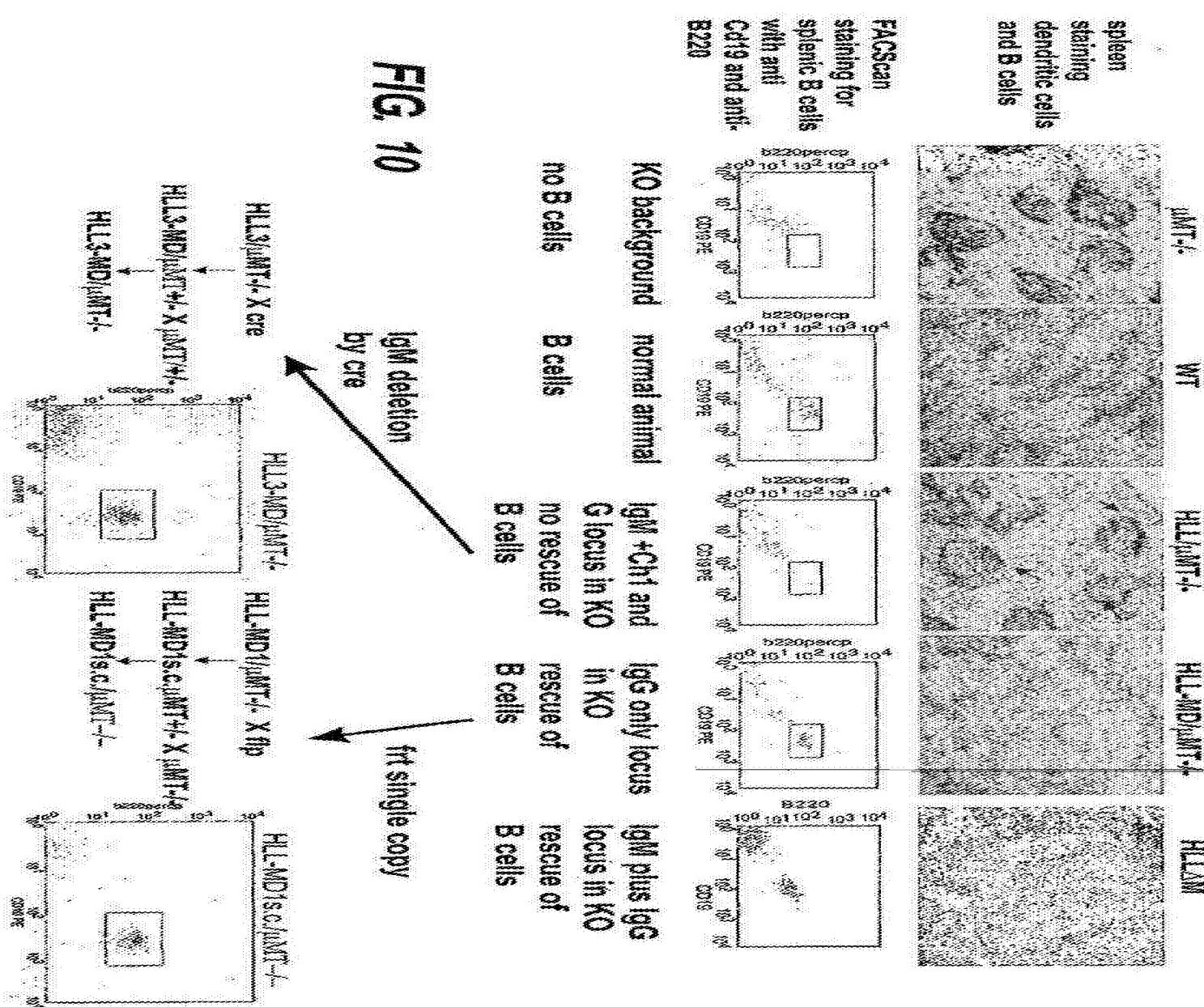
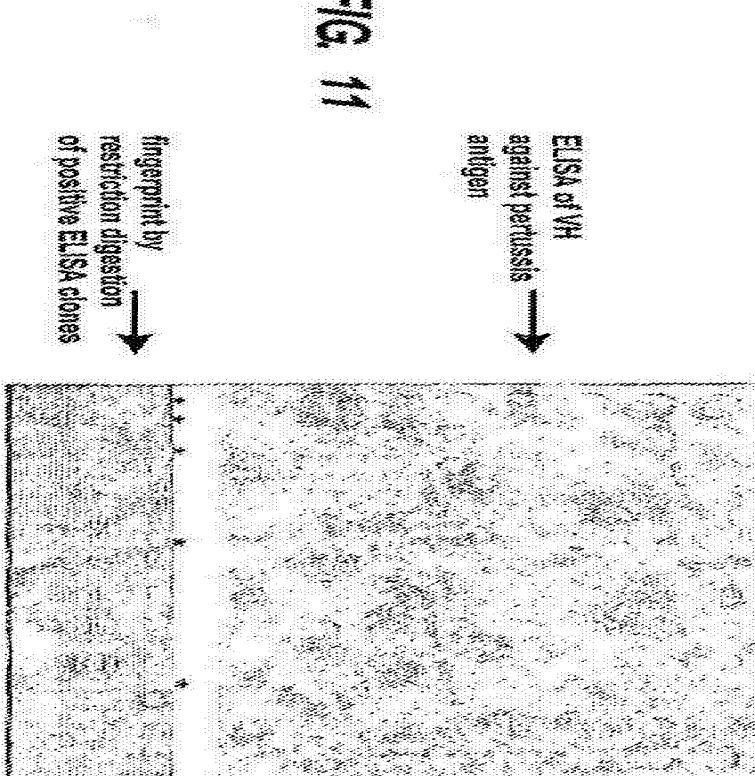


FIG. 11

ELISA of VH
against pertussis →
antigen



B. Pertussis

1 RLSCAASGSFSNANGWYRAAPKOREVAANTSAGSTNWADSKVAKFTSRDNKNTVWLQNSLKPEDTAVYCNAGFTHRE
 2 RLSCAASGSFSNANGWYRAAPKOREVAANTSAGSTNWADSKVAKFTSRDNKNTVWLQNSLKPEDTAVYCNAGFTHRE
 3 RLSCAASGSFSNANGWYRAAPKOREVAANTSAGSTNWADSKVAKFTSRDNKNTVWLQNSLKPEDTAVYCNAGFTHRE
 4 RLSCAASGSFSNANGWYRAAPKOREVAANTSAGSTNWADSKVAKFTSRDNKNTVWLQNSLKPEDTAVYCNAGFTHRE
 5 RLSCAASGSFSNANGWYRAAPKOREVAANTSAGSTNWADSKVAKFTSRDNKNTVWLQNSLKPEDTAVYCNAGFTHRE

V. cholerae

<u>CDR3</u>	<u>RINGE</u>
"WNGGGTUTTSERGCV..."	
"WNGGGTUTTSERGCV..."	
"WNGGGTUTTSERGCV..."	
"DNGGGTUTTSERGCV..."	
"WNGGGTUTTSERGCV..."	

Sequence of clones indicated by an asterisk in the fingerprint.
Note the short CDR3 region.

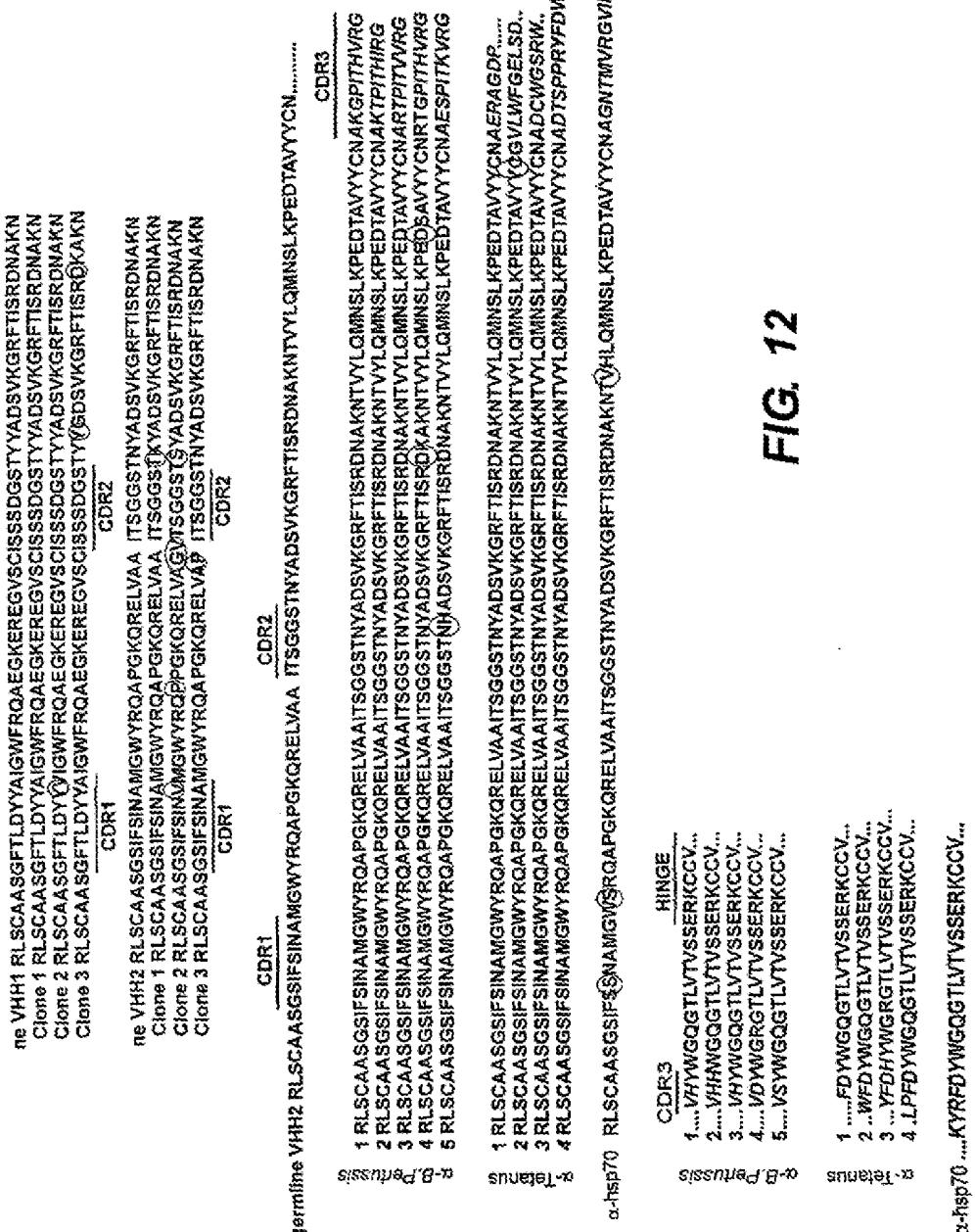


FIG. 13

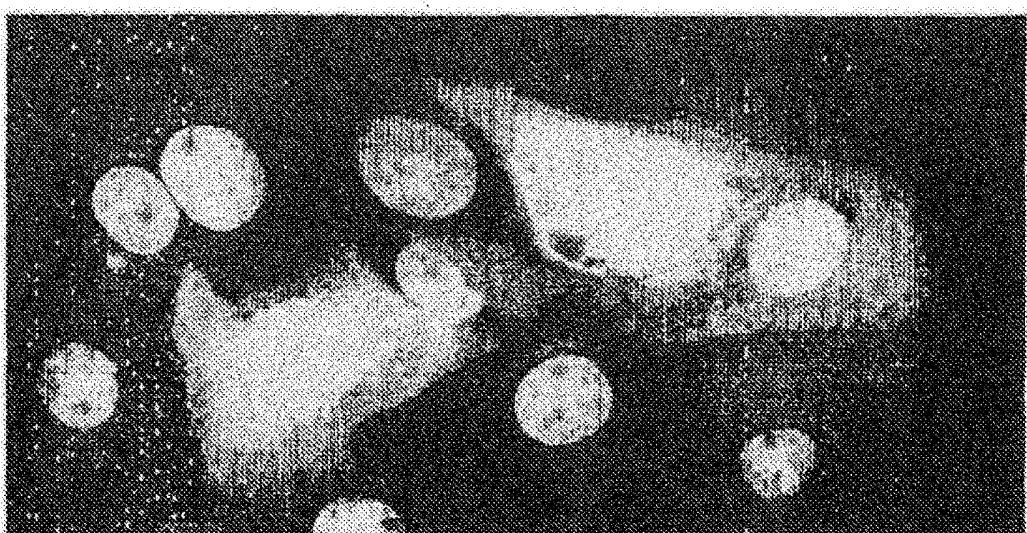
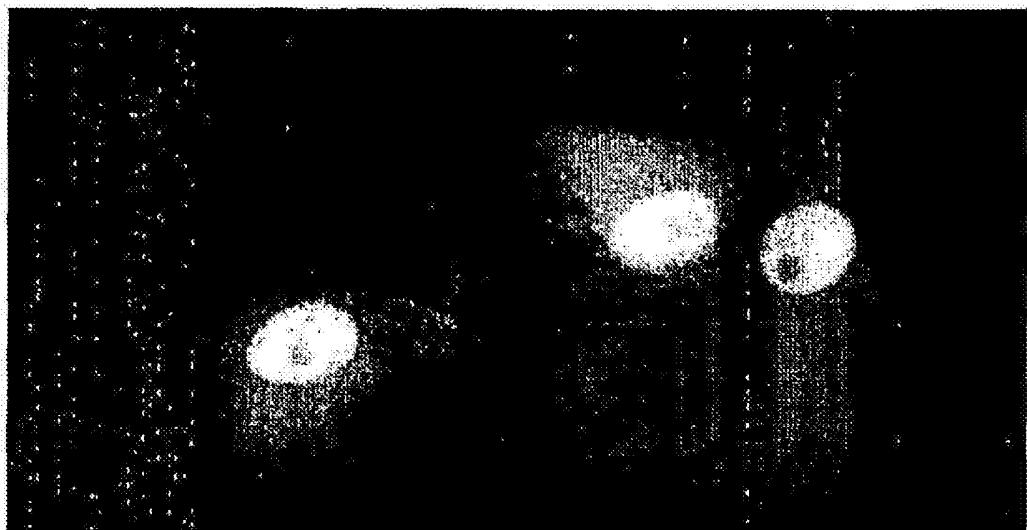


FIG. 14

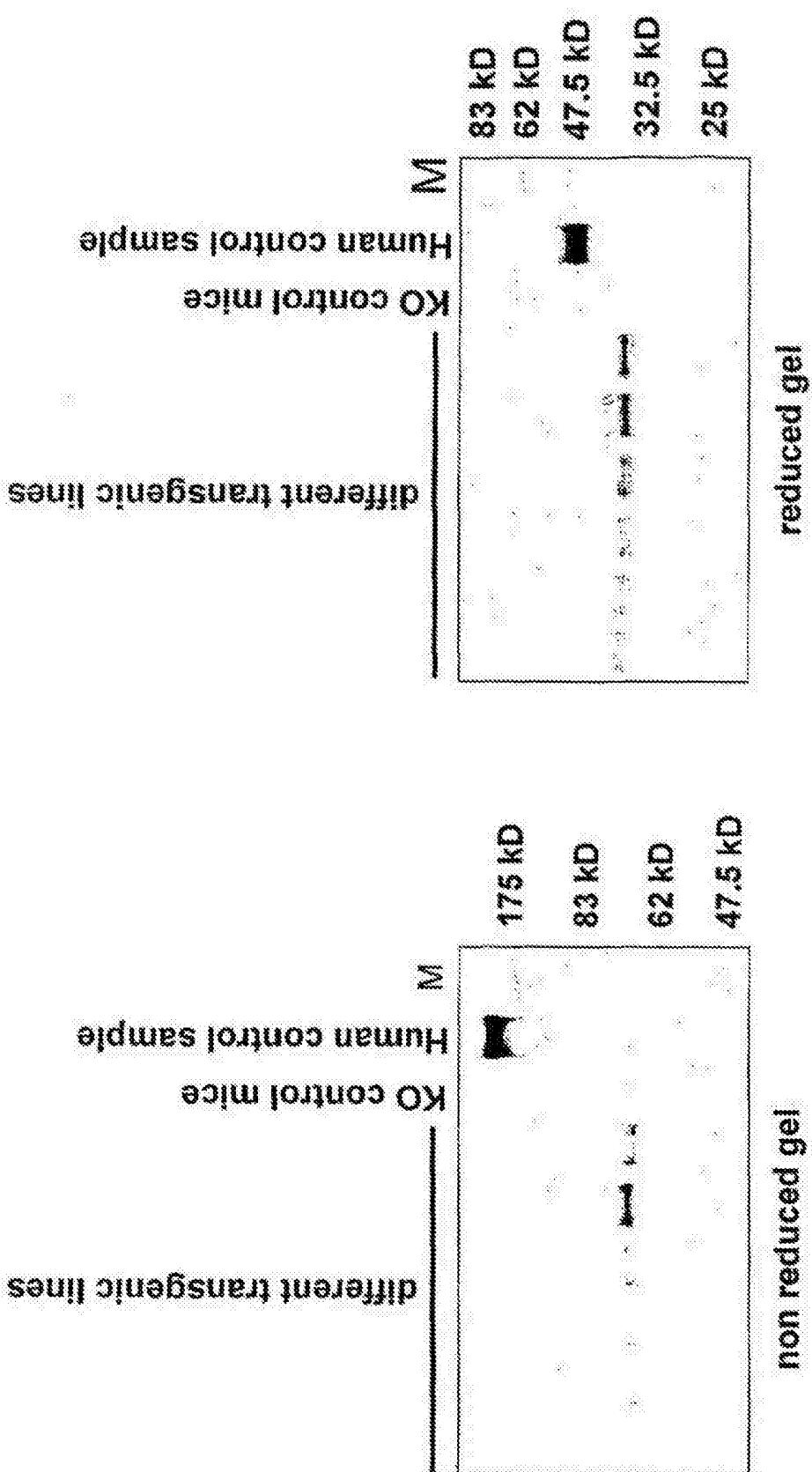


FIG. 15

Size fractionation of human IgM mixed with human single chain IgM produced by the IgM plus IgG locus mice

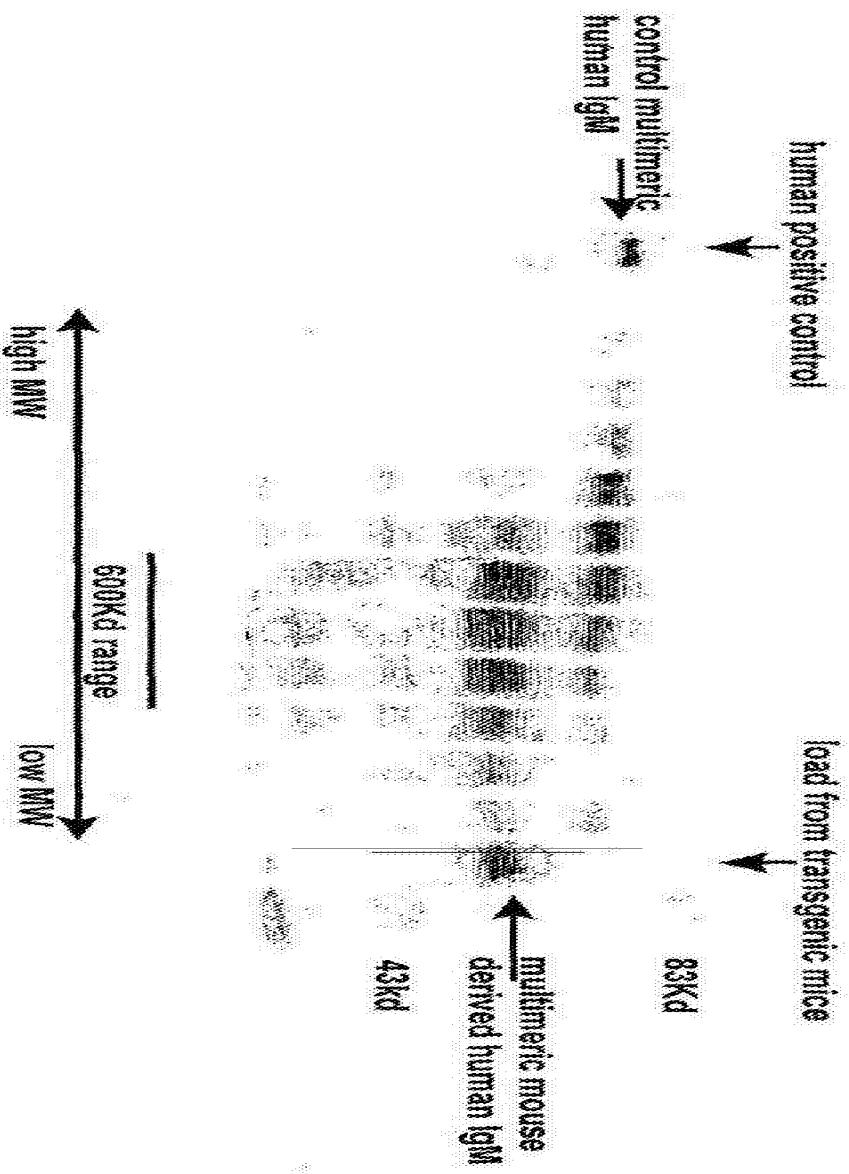


FIG. 16

ELISA of single chain IgM and IgG antibodies raised against human TNF α

positive hybridoma serum of the immunised mouse

anti human IgG

anti human IgM

