



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 321**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04077639 .5**

96 Fecha de presentación : **18.08.1993**

97 Número de publicación de la solicitud: **1498427**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

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

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2010

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

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

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoglobulinas desprovistas de cadenas ligeras.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 La publicación de Blier P.R. *et al* (The Journal of Immunology, vol. 139, 3996-4006, nº 12, 15 de diciembre de 1987) describe secuencias de nucleótidos incompletas obtenidas a partir de hibridomas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 35 a) clonar en un vector Bluescript una secuencia de ADN o ADNc que codifica para el dominio V_{HH} de una inmunoglobulina desprovista de cadena ligera obtenida por ejemplo a partir de linfocitos o Camellos,
- b) recuperar el fragmento clonado después de la amplificación usando un cebador 5' que contiene un sitio *Xho* y un cebador 3' que contiene el sitio *Spe* que tiene la siguiente secuencia

40 **TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG,**

- c) clonar el fragmento recuperado en fase en el vector inmuno PBS después de la digestión del vector con las enzimas de restricción *Xho* y *Spe*,
- 45 d) transformar las células hospederas, especialmente de *E. coli* por transfección con el vector inmuno PBS recombinante del paso c;
- e) recuperar el producto de expresión de la secuencia de codificación de V_{HH} , por ejemplo usando anticuerpos cultivados contra el dominio V_{HH} del dromedario.

50

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

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

ES 2 338 321 T3

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

- obtener una secuencia de ADN o de ADNc que codifique para un dominio V_{HH} o para una parte del mismo, que tenga un determinado sitio específico de unión al antígeno,
- amplificar el ADN o el ADNc obtenido usando un cebador 5' que contenga un codón de iniciación y un sitio *HindIII*, y un cebador 3' que contenga un codón de terminación que tenga un sitio *XhoI*, recombinar el ADN o el ADNc amplificado en los sitios *HindIII* (posición 2650) y *XhoI* (posición 4067) de un plásmido pMM984,
- transfectar las células permisivas, especialmente las células NB-E, con el plásmido recombinante,
- recuperar los productos obtenidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 338 321 T3

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

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

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

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

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

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

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

- no se adsorbe mediante cromatografía en columna de Sepharosa Proteína G
- se adsorbe mediante cromatografía en columna de Sepharosa Proteína A
- 35 - tiene un peso molecular de alrededor de 100 kd tras la elución con un tampón de pH 4,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%), ajustado a pH 4,5 mediante NaOH),
- 40 - consiste en cadenas polipeptídicas pesadas γ2 de un peso molecular de alrededor de 46 kd, preferiblemente de 45 tras reducción.

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

- 45 - se adsorbe mediante cromatografía en una columna de Sepharosa Proteína A,
- tiene un peso molecular de alrededor de 100 kd tras la elución con un tampón de pH 3,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%),
- 50 - se adsorbe mediante cromatografía en una columna de Sepharosa Proteína G y se eluye con un tampón a pH 3,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58%),
- 55 - consiste en cadenas polipeptídicas pesadas γ3 de un peso molecular de alrededor de 45 kd, en particular entre 43 y 47 kd tras reducción.

60 Las inmunoglobulinas preparadas de acuerdo con la invención que están desprovistas de cadenas ligeras, comprenden no obstante en sus cadenas pesadas, una región constante y una región variable. La región constante comprende diferentes dominios.

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

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

ES 2 338 321 T3

para el dominio de la estructura 1

```

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

```

para el dominio de la estructura 4

```

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

```

para el dominio CDR3

```

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

```

Tal como se ha afirmado anteriormente, las inmunoglobulinas preparadas de acuerdo con la invención están preferiblemente desprovistas de la totalidad de su dominio C_H1.

ES 2 338 321 T3

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

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

para el dominio C_{H2} :

10 **APELLGGPTVFIFPPKPKDVLSITLTP**
 APELPGGPSVFVFPKPKDVLSISGRP
 APELPGGPSVFVFPKPKDVLSISGRP
15 **APELLGGPSVFIFPPKPKDVLSISGRP**

para el dominio C_{H3} :

20 **GQTRPQVYTLA**
 GQTRPQVYTLAPXRLEL
25 **GQPREPQVYTLPPSRDEL**
 GQPREPQVYTLPPSREEM
 GQPREPQVYTLPPSQEEM
30

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

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

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

40 **GTNEVCKCPKCP**

45 o,

EPKIPQPQPKPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP

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

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

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

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

ES 2 338 321 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

40 La invención se refiere además a un procedimiento para la preparación de un fragmento de una inmunoglobulina que se ha descrito anteriormente en este documento y especialmente de un fragmento seleccionado del grupo siguiente y se refiere a los fragmentos así obtenidos:

- un fragmento que corresponde a una cadena polipeptídica pesada de una inmunoglobulina desprovista de cadenas ligeras,
- 45 - los fragmentos obtenidos por la digestión enzimática de las inmunoglobulinas de la invención, especialmente aquellos obtenidos por la digestión parcial con papaína que conduce al fragmento Fc (fragmento constante) y que conduce al fragmento FV_{HHH} (que contiene los sitios de unión al antígeno de las cadenas pesadas) o su dímero F(V_{HHH})₂, o un fragmento obtenido mediante la digestión adicional con papaína del fragmento Fc, que conduce al fragmento pFc correspondiente a la parte C-terminal del fragmento Fc,
- 50 - los fragmentos homólogos obtenidos con otras enzimas proteolíticas,
- un fragmento de al menos 20 aminoácidos de la región variable de la inmunoglobulina, o la región variable completa, especialmente un fragmento correspondiente a los dominios V_{HH} aislados o a los dímeros V_{HH} unidos al disulfuro de la bisagra,
- 55 - un fragmento que corresponde a al menos 10, y preferiblemente 20, aminoácidos de la región constante o a la región constante completa de la inmunoglobulina.

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

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

ES 2 338 321 T3

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

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

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

```

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

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

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

```

APELLGGPSVFVFPPKPKDVLSISGXPK
 APELPGGPSVFVFPTKPKDVLSISGRPK
 5 APELPGGPSVFVFPPKPKDVLSISGRPK
 APELLGGPSVFIFPPKPKDVLSISGRPK
 GOTREPQVYTLAPXRLEL
 10 GQPREPQVYTLPPSRDEL
 GQPREPQVYTLPPSREEM
 15 GQPREPQVYTLPPSQEEM
 VTVSSGTNEVCKCPKCPAPELPGGPSVFVFPP

○

VTVSSEPKIQPQPKPQPPQPPQPKPQPKPEPECTCPKCPAPELLGGPSVFIFP
 25 GTNEVCKCPKCP
 APELPGGPSVFVFPP
 EPKIQPQPKPQPPQPPQPKPQPKPEPECTCPKCP
 30 APELLGGPSVFIFP

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

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

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

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

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

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

Esto puede hacerse a nivel del repertorio de V_{HH} no reconfigurado, usando ADN derivado de un tejido o célula tipo escogidos arbitrariamente, o a nivel del repertorio de V_{HH} no reconfigurado, usando ADN obtenido a partir de los

ES 2 338 321 T3

linfocitos B. Sin embargo, resulta más interesante transcribir el ARNm a partir de las células que producen anticuerpos y clonar el ADNc con o sin amplificación anterior en un vector adecuado. Esto dará como resultado la obtención de anticuerpos que ya han sufrido maduración de afinidad.

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

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

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

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

20
AG GTC CAG CTG CTC GAG TCT GG
AG CTC CAG CTG CTC GAG TCT GG
25 AG GTC CAG CTT CTC GAG TCT GG
Sitio XhoI

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

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

CTCGAGT₁₂.

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

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

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

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

- 50 a) tratar una muestra que contiene células linfoides, especialmente linfocitos periféricos, células del bazo, ganglios linfáticos u otro tejido linfoide procedente de un animal sano, especialmente seleccionado a partir de los Camélidos, con el fin de separar las células linfoides,
- 55 b) separar el ARN poliadenilado de otros ácidos nucleicos y componentes de las células,
- c) hacer reaccionar el ARN obtenido con una transcriptasa inversa, con el fin de obtener el ADNc correspondiente,
- 60 d) poner en contacto el ADNc de la etapa c) con los cebadores 5' correspondientes al dominio V_H del ratón de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas, cebador que contiene un sitio de restricción determinado, por ejemplo un sitio *XhoI* y con los cebadores 3' que corresponden a la parte N-terminal de un dominio C_H2 que contiene un sitio *KpnI*,
- 65 e) amplificar el ADN,
- f) clonar la secuencia amplificada en un vector, especialmente en un vector Bluescript,

ES 2 338 321 T3

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

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

10 La recuperación de las secuencias que codifican para las inmunoglobulinas de cadena pesada también puede lograrse mediante la selección de los clones que contienen secuencias de ADN que tienen un tamaño compatible con la falta de dominio C_{H1} .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 338 321 T3

- la immortalización de los linfocitos, obtenidos por ejemplo de la sangre periférica de los Camélidos previamente inmunizados con un antígeno determinado, con una célula inmortal y preferiblemente con células de mieloma, con el fin de formar un hibridoma,
- el cultivo de las células immortalizadas (hibridoma) formadas y la recuperación de las células que producen los anticuerpos que tienen la especificidad deseada.

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

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

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

- clonar en vectores, especialmente en fagos y más particularmente en bacteriofagos filamentosos, las secuencias de ADN o de ADNc obtenidas a partir de los linfocitos, especialmente los PEL de los Camélidos previamente inmunizados con determinados antígenos,
- transformar las células procarióticas con los vectores anteriores en condiciones que permitan la producción de anticuerpos,
- seleccionar los anticuerpos por su estructura de cadena pesada y adicionalmente sometiendo a la selección por afinidad al antígeno,
- recuperar los anticuerpos que tienen la especificidad deseada.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Otros marcadores radiactivos interesantes son, por ejemplo, el indio y especialmente el indio III, o el yodo, especialmente el I^{121} , I^{125} e I^{123} .

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

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

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

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

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

Un dominio V_H o V_L adicional modificado de una inmunoglobulina de cuatro cadenas se caracteriza por la unión de los bucles CDR o de las regiones FK mediante la introducción de cisteínas apareadas, seleccionándose la región CDR entre la CDR_1 y la CDR_3 , siendo la región FW la región FW_2 y, especialmente, porque una de las cisteínas introducidas está en la posición 31, 33 de la FR_2 o en la 45 de la CDR_2 y la Otra en la CDR_3 .

Especialmente, la introducción de cisteínas apareadas es de manera que el bucle del CDR_3 esté unido al dominio FW_2 o al CDR_1 y más especialmente, la cisteína del CDR_3 del V_H está unida a una cisteína en la posición 31 ó 33 del FW_2 o en la posición 45 del CDR_2 .

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

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

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

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

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

El constructo se inserta entonces entre las posiciones 2650 (*Hind*III) y 4067 (*Xba*I) dentro del plásmido.

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

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

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

Las inmunoglobulinas de cadena pesada pueden producirse además en células de plantas, especialmente en plantas transgénicas. Como ejemplo, las inmunoglobulinas de cadena pesada pueden producirse en plantas usando el plásmido pMon530 (Roger *et al.* Meth Enzym 153 1566 1987), vector de expresión constitutivo de plantas, tal como se ha descrito para los anticuerpos clásicos de cuatro cadenas (Hiatt *et al.* Nature 342 76-78, 1989) usando una vez más los cebadores apropiados de PCR, tal como se ha descrito anteriormente, para generar un fragmento de ADN en la fase correcta.

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

Figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

(A) lisado de antígenos de *Trypanosoma evansi* marcado con ³⁵S metionina (recuento de 500.000) fue añadido a tubos Eppendorf conteniendo 10 µl de suero o, 20 µl de IgG₁, IgG₂ o IgG₃ en 200 µl de tampón de inmunoprecipitación a pH 8.3 conteniendo 0.1 M TLCK como inhibidor de proteinasa y se hicieron girar lentamente a 4°C durante una hora. Los tubos fueron luego suplementados con 10 mg de Sepharosa Proteína A suspendida en 200 µl del mismo tampón a pH 8.3 e incubados a 4°C durante una hora adicional.

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

(B) 20 µl de IgG₁, IgG₂ e IgG₃ de animales saludables e infectados con tripanosoma fueron separados mediante SDS-PAGE sin reducción o calentamiento previos. Las muestras separadas fueron entonces electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, una parte de la membrana fue teñida con Rojo de Ponceau para localizar el material proteico y el resto fue incubado con ovoalbúmina 1% en tampón TST (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.05%) para bloquear los sitios de unión a la proteína.

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

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

Se disolvieron 14 mg de IgG3 purificada en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 que contenía EDTA 2 mM. Se digirieron mediante 1 hora de incubación a 37°C con mercuriopapaína (enzima al 1% en proporción de proteína) activada mediante cisteína 5.10⁴M. La digestión se bloqueó por la adición de yodoacetamida en exceso (4.10²M) (13). Tras la centrifugación del digerido en una centrífuga Eppendorf durante 5 min a 15.000 rpm, los fragmentos de papaína se separaron en una columna de Sepharosa Proteína A en las fracciones de unión (B) y de no unión (NB). La fracción de unión se eluyó de la columna con tampón glicina HCl 0,1 M a pH 1,7.

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

Figura 6: • Representación esquemática de inmunoglobulinas que tienen cadenas polipeptídicas pesadas y están desprovistas de cadenas ligeras, con respecto a la inmunoglobulina convencional del modelo de cuatro cadenas.

• Representación de una sección bisagra.

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

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

I Anticuerpos de cadena pesada en los camélidos

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

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

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

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

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

Para este propósito, las fracciones correspondientes de IgG₁, IgG₂, IgG₃ se prepararon a partir del suero de un camello sano y a partir del suero de camellos con un título elevado de antitripanosoma, medido mediante el Ensayo de Aglutinación (3). En radioinmunoprecipitación, se demostró que la IgG₁, la y la IgG₃ derivadas del camello infectado, que indican amplia heterogeneidad y complejidad de repertorio (Fig. 3A), se unen a un gran número de antígenos presentes en un lisado de tripanosoma marcado por ³⁵S metionina.

En los experimentos de inmunotransferencia, el lisado de tripanosoma marcado con ³⁵S metionina se une a IgG₁, IgG₂, IgG₃ separadas por SDS-PAGE, obtenidas a partir de animales infectados (Fig. 3B).

Esto lleva a concluir que las cadenas pesadas del camélido IgG₂ e IgG₃ son auténticos anticuerpos que unen antígenos.

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

Las inmunoglobulinas se caracterizan por un patrón complejo de IEF (isoelectroenfoque) que refleja su heterogeneidad extrema. Para determinar si las dos cadenas pesadas que constituyen la IgG₂ y la IgG₃ son o no idénticas, se observó el patrón de isoelectroenfoque (I.E.F) antes y después de la separación de la cadena mediante reducción y alquilación usando yodoacetamida como agente alquilante.

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

Bajo reducción y alquilación por yodoacetamida, el patrón observado no está modificado para la IgG₂ y la IgG₃ de *Camelus dromedarius*, indicando que estas moléculas están compuestas de dos cadenas pesadas idénticas que migran a la misma posición que la molécula no reducida a partir de la que se han originado.

Por el contrario, el patrón de T.E.F. de la IgG₁ se modifica completamente tras la reducción, ya que el punto isoelectrónico de cada molécula se determina por la combinación de los puntos isoelectrónicos de las cadenas ligera y pesada, que tras la separación, migrarán a posiciones diferentes.

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

Normalmente, la cadena pesada aislada de las inmunoglobulinas de mamífero tienden a agregarse considerablemente, pero sólo se solubilizan mediante las cadenas ligeras (8, 9) que se unen al dominio C_H1 de la cadena pesada.

En humanos y ratones, varios mielomas espontáneos o inducidos producen una inmunoglobulina patológica compuesta únicamente por cadenas pesadas (enfermedad de la cadena pesada). Estas cadenas pesadas proteicas del mieloma llevan delecciones en los dominios C_H1 y V_{HH} (10). La razón por la que las cadenas pesadas de longitud completa no dan lugar a cadenas pesadas secretadas en tales inmunoglobulinas patológicas, parece provenir del hecho de que la síntesis de Ig implica una proteína chaperonina, la proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina o BIP (11), que normalmente está sustituida por la cadena ligera (12). Es posible que el papel primordial de la cadena ligera

en las inmunoglobulinas del modelo de cuatro cadenas es el de un acompañante asignado a la cadena pesada y que la aparición de los repertorios de cadena ligera sólo ha sido una ventaja evolutiva.

Las cadenas $\gamma 2$ y $\gamma 3$ son considerablemente más cortas que la cadena γ normal de mamífero. Esto sugeriría que se han producido delecciones en el dominio C_H1 . Las diferencias en los tamaños de las inmunoglobulinas $\gamma 2$ y $\gamma 3$ de los camélidos del viejo y del nuevo mundo, sugieren que las delecciones se produjeron en varias etapas evolutivas, especialmente en el dominio C_H1 .

II Las inmunoglobulinas de cadena pesada de los camélidos carecen del dominio C_H1

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

Una combinación de digestión de papaína y cromatografía de afinidad a la Proteína A permitieron la separación de varios fragmentos que dan información sobre la estructura general de la IgG3.

La IgG3 del camello (*Camelus dromedarius*) purificada mediante cromatografía de afinidad en Sepharosa Proteína A se digirió parcialmente con papaína y el digesto se separó en Sepharosa Proteína A en fracciones de unión y de no unión. Estas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción y no reducción (fig 4).

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

La secuenciación del extremo N-terminal del fragmento de 28 kd da una secuencia homóloga a la parte N-terminal del dominio C_H2 de γ y por tanto, al extremo N-terminal del fragmento Fe. La secuencia N-terminal del fragmento de 14,4 kd corresponde a la última lisina de un C_H2 de γ y al extremo N-terminal de un dominio C_H3 de γ (Tabla 1). El peso molecular (PM) de los fragmentos de papaína y la identificación de sus secuencias N-terminales llevaron a concluir que los dominios C_H2 y C_H3 de las cadenas pesadas $\gamma 3$ son normales en tamaño y que la delección debe producirse, o bien en el dominio C_H1 , o en el V_{HH} para generar la cadena $\gamma 3$ más corta. Las fracciones que no se unen a la Sepharosa Proteína A contienen dos bandas de 34 y 17 kd que están más difusas en SDE-PAGE, indicando que se originan a partir de la parte variable N-terminal de la molécula (fig 4).

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

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

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

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

ES 2 338 321 T3

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

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

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

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

Tras la amplificación, los productos de la PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 1,2% (p/v). El aclaramiento de los productos de la PCR incluyó una extracción de fenol-cloroformo, seguida por purificación adicional por HPLC (columna GEN-PAC FAX, Waters) y finalmente usando el kit MERMAID o GENE CLEAN II, BIO 101, Inc) según fuese apropiado. Tras estas etapas de purificación, el ADNc amplificado se digirió entonces con *Eco*RI y *Kpn*I para los clones de la serie #56 y con *Xho*I y *Kpn*I para los clones de la serie #72. Una extracción final con fenol-cloroformo precedida por la ligación en pUC 18 (clones de la serie #56) o en pBluescript® (clones de la serie #72).

Todos los clones obtenidos fueron más pequeños de 860 pares de base de lo que se esperaba si poseían una región completa V_{HH} y C_{H1}. Los datos parciales de la secuencia correspondientes al N'-terminal de la región V_{HH} revelan que de entre 20 clones, 3 fueron idénticos y posiblemente no independientes. Las secuencias obtenidas se asemejan al subgrupo III humano y a los subgrupos murinos IIIa y IIIb (Tabla 2).

Se obtuvieron los clones correspondientes a dos juegos diferentes de secuencias proteicas C_{H2}. Un primer juego de secuencias (#72/41) tenía una región C_{H2} N-terminal idéntica a la obtenida mediante secuenciación de proteínas de los fragmentos de papaína de 28 kd de la cadena pesada γ 3, una corta región bisagra que contenía 3 cisteínas y una región variable correspondiente a los residuos de la estructura (FR4) codificada por los minigenes J que se adhieren a la bisagra. El dominio C_{H1} falta por completo. Este ADNc corresponde a la cadena γ 3 (Tabla 4).

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

La secuencia correspondiente al C_{H3} y a la parte restante del C_{H2} se obtuvo por PCR del ADNc usando como cebador *Kpn*I, un poliT en el que el sitio de restricción *Kpn*I se había insertado en el extremo 5'. La secuencia total de la cadena γ 3 corresponde con un peso molecular (PM) que está en concordancia con los datos obtenidos a partir de la electroforesis en SDS-PAGE.

La secuencia de esta cadena γ 3 presenta similitudes con otras cadenas γ , excepto que carece del dominio C_{H1}, siendo el dominio V_{HH} adyacente a la bisagra.

Una o las tres cisteínas podrían ser probablemente responsables de mantener a las dos cadenas γ 3 juntas.

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

La papaína puede romper la molécula a cada lado de los disulfuros de la bisagra y también entre C_{H2} y C_{H3}. Bajo condiciones no reductoras, los dominios V_{HH} de la IgG3 pueden aislarse como dímero unido por disulfuro o como monómero, dependiendo del sitio de rotura de la papaína.

Un segundo juego de clones #72/29 tenía una secuencia ligeramente diferente para el C_{H2} y se caracterizaba por una bisagra muy larga precedida inmediatamente por el dominio variable. Esta región bisagra tiene 3 cisternas en su extremo C-terminal en una secuencia homóloga a la bisagra de γ 3. Tal segundo juego de clones podría representar la subclase IgG2. Para la parte constante de la γ 3 y también para la supuesta γ 2, la mayoría de los clones son idénticos, mostrando las secuencias específicas de γ 2 o γ 3. Sin embargo, algunos clones, tales como #72/1, muestran diferencias menores. Por ejemplo, en el caso de los clones #72/1 se detectan diferencias en dos nucleótidos.

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

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

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

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

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

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

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

El único dominio V_{HH} también podría permitir probablemente la libertad rotacional considerable del sitio de unión frente al dominio Fc.

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

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

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

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

ES 2 338 321 T3

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

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

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

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

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

(Tabla pasa a página siguiente)

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

C_H2	C_H3	360	370
Camello	$\gamma 3$ 14Kd	- K G Q T R E P Q V Y T L A P X R L E L - -	
Humano	$\gamma 1$	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L - -	
C_H2/C_H3	$\gamma 2, \gamma 3$	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M - -	
	$\gamma 4$	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M - -	

Tabla 1

Comparación de las secuencias C_H2 y C_H3 del extremo N-terminal del Camello con las secuencias traducidas del ADNc de las inmunoglobulinas del Camello y con las secuencias γ correspondientes humanas. (Numeración según Kabat et al (1987) (7)).

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

Derivado del cebador	10										20										30										#72/4 #72/3 #72/7 #72/17 #72/18 #72/2 V _H III _A del ratón V _H III de humano
	G G S V Q T G G S L R L S C E I S G L T F D										G G S V Q T G G S L R L S C A V S G F S F S										G G S E Q G G S L R L S C A I S G Y T Y G										
	G G S V Q P G G S L T L S C T V S G A T Y S										G G S V Q A G G S L R L S C T G S G F P Y S										D V Q L V A S G G S V G A G G S L R L S C T A S G D S F S										
	E V K L V E S G G L V E P G G S L R L S C A T S G F T F S										E V Q L L S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S																				

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

ES 2 338 321 T3

TABLA 3

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

[illegible]

TABLA 4

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

10			20			40		
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASG	CDRL	WVRQA	PGKGLEWVS	CDR2		
GG	SVQGGGSLRL	SCAISG	CDRL	WFREG	PGKEREGIA	CDR2		
GG	SVQAGGSLRL	SCASSS	CDRL	WYRQA	PGKEREFVS	CDR2		
70			80			90		
RFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDTAVY	YCAR	CDR3	WGQGITLVT	VSS		110
RFTIS	QDSTLKTMYL	LMNNLKPEDTGTY	YCAA	CDR3	WGQGTQVT	VSS		
RFTIS	QDSAKNTVYL	QMNSLKPEDTAMY	YCKI	CDR3	WGQGTQVT	VSS		
V _H del camello			Bisagra			CH2		
camello	WGQGTQVT	VSS	GTNEVCCKCPKCP			APELPGG PSVFVFP		
	WGQGTQVT	VSS	EPKIPQPKPKPQPOP					
			QPKPKPQ					
			KPEPECTCPKCP			APELLGG PSVFIFP		

TABLA 5 (1)

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

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

TABLA 5 (2)

Bibliografía

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

REIVINDICACIONES

1. Una región V_H derivada de una inmunoglobulina de 4 cadenas, que contiene un sitio de señalización de antígeno o varios sitios de fijación de antígeno y en la cual los residuos de aminoácidos han sido reemplazados parcialmente por secuencias específicas o residuos de aminoácidos de una inmunoglobulina (denominada inmunoglobulina de cadena pesada) que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas capaces de reconocer y fijar uno o varios antígenos, estando dicha inmunoglobulina de cadena pesada desprovista de cadenas ligeras y obteniéndose a partir de Camélidos y en la cual, en dicha V_H derivada, la leucina, prolina o glutamina en la posición 45 de la región V_H ha sido reemplazada por un residuo de aminoácido cargado o un residuo cisteína.

2. Una región V_H derivada de una inmunoglobulina de 4 cadenas, en donde los residuos de aminoácidos han sido reemplazados parcialmente por secuencias específicas o residuos de aminoácidos de una inmunoglobulina (denominada inmunoglobulina de cadena pesada) que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas capaces de reconocer y fijar uno o varios antígenos, estando dicha inmunoglobulina de cadena pesada desprovista de cadenas ligeras y obteniéndose a partir de Camélidos, y en la cual, en dicha V_H derivada, la leucina, prolina o glutamina en la posición 45 de la región V_H ha sido reemplazada por un residuo de aminoácido cargado o un residuo cisteína y que tiene mayor solubilidad.

3. La región V_H de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la leucina, prolina o glutamina en la posición 45 de la región V_H ha sido reemplazada por un residuo arginina, ácido glutámico o cisteína.

4. Una región V_H de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en donde dicha V_H contiene en sí misma un sitio de fijación de antígeno o varios sitios de fijación de antígeno y funciona en ausencia de V_L .

5. Una región V_H de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en donde una mayor solubilidad de dicha V_H se consigue hasta una concentración superior a 0,5 mg/ml, preferiblemente por encima de 1 mg/ml y más ventajosamente por encima de 2 mg/ml.

6. La región V_H de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se establece un enlace disulfuro dentro de la región variable, que implica residuos de aminoácidos en la región CDR3.

7. La región V_H de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la cual los bucles CDR de la región están enlazados a otras partes de la región V_H por la introducción de cisteínas apareadas, en particular en las cuales el bucle CDR₃ está enlazado al FR₂ o CDR₁ y más especialmente donde la cisteína del CDR₃ de la V_H está enlazada a una cisteína en la posición 31 ó 33 de CDR₁ o en la posición 45 de FR₂.

8. La región V_H de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los bucles CDR están enlazados a otras partes de una región V por introducción de cisteínas apareadas.

9. Un proceso para la preparación de una inmunoglobulina de cadena pesada que está desprovista de cadenas ligeras y del primer dominio (CH1) de la región constante de sus cadenas polipeptídicas pesadas o un fragmento de la misma, seleccionándose dicho fragmento de un fragmento correspondiente a una cadena polipeptídica pesada, fragmentos obtenidos por digestión enzimática, especialmente los obtenidos por digestión parcial con papaína que conducen al fragmento Fc, conduciendo al fragmento $FV_{HH}h$ o su dímero $F(V_{HH}h)_2$, o un fragmento obtenido por digestión ulterior con papaína del fragmento Fc, conduciendo al fragmento pFc, fragmentos homólogos obtenidos con otras enzimas proteolíticas, un fragmento de al menos 20 aminoácidos de la región variable de la inmunoglobulina, o el dominio variable completo, especialmente un fragmento correspondiente a los dominios aislados V_{HH} o a los dímeros V_{HH} enlazados al disulfuro bisagra, o un fragmento correspondiente a al menos 10, preferiblemente 20 aminoácidos de la región constante o a la región constante completa de la inmunoglobulina, comprendiendo dicho proceso los pasos de:

- seleccionar inmunoglobulinas que tienen dos cadenas polipeptídicas pesadas y que están desprovistas de cadenas polipeptídicas ligeras de un animal de la familia Camélidos y recuperar las mismas.

10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende adicionalmente el paso de preparar fragmentos de las inmunoglobulinas seleccionadas.

11. Un proceso para la preparación de la región V_H de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende los pasos de:

- reemplazar residuos de aminoácidos en la región V_H derivados de una inmunoglobulina de 4 cadenas, o por secuencias o residuos de aminoácidos específicos de una inmunoglobulina (denominada inmunoglobulina de cadena pesada) que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas capaces de reconocer y fijar uno o varios antígenos, estando dicha inmunoglobulina de cadena pesada desprovista de cadenas ligeras y obteniéndose de Camélidos
- recuperar dicha región V_H .

ES 2 338 321 T3

12. Un proceso para la preparación de la región V_H de acuerdo con la reivindicación 11, en donde las secuencias o residuos de aminoácidos específicos de una inmunoglobulina (denominada inmunoglobulina de cadena pesada) que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas capaces de reconocer y fijar uno o varios antígenos, estando dicha inmunoglobulina de cadena pesada desprovista de cadenas ligeras, se insertan en dicha región V_H (sic) son fragmentos
- 5 peptídicos de la región de la inmunoglobulina de cadena pesada V_{HH} .

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

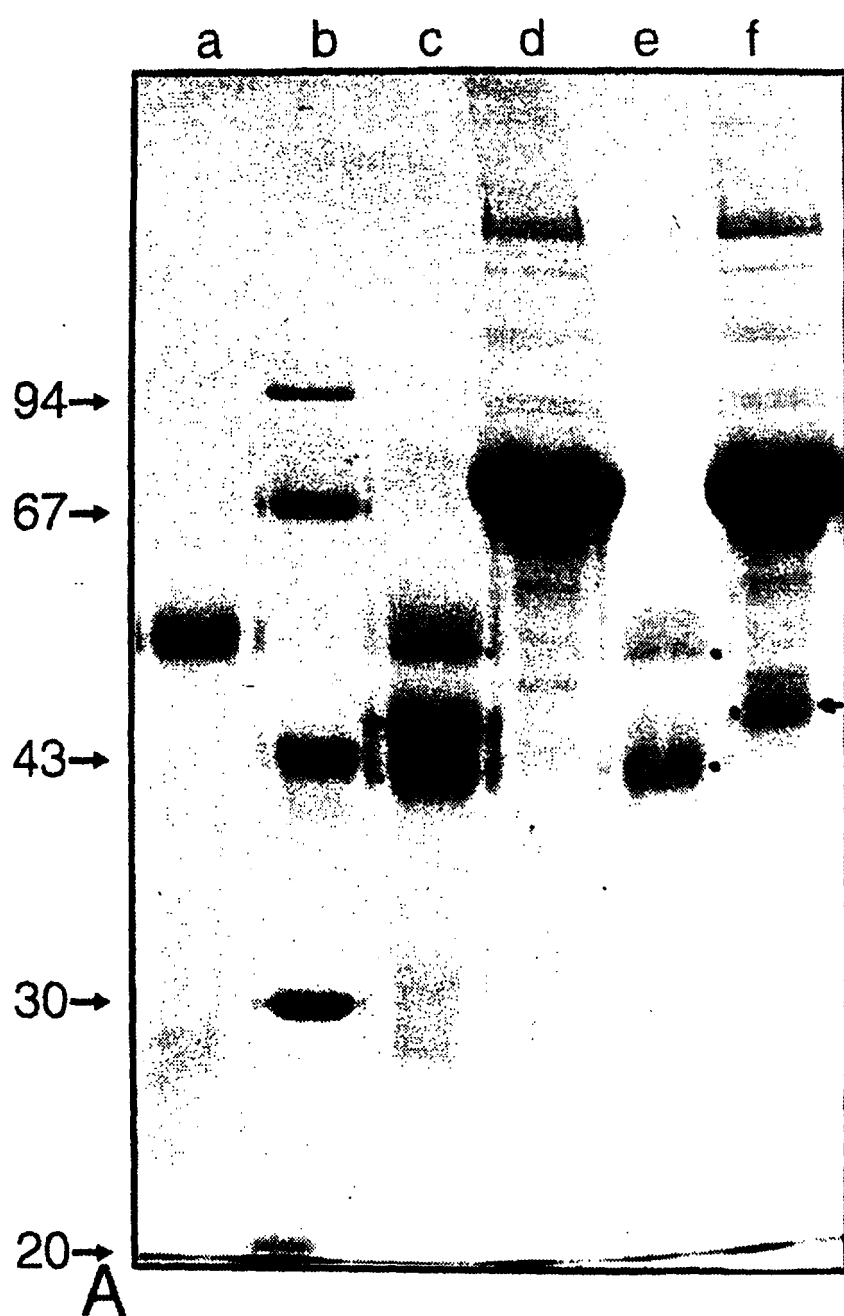


FIGURA 1A

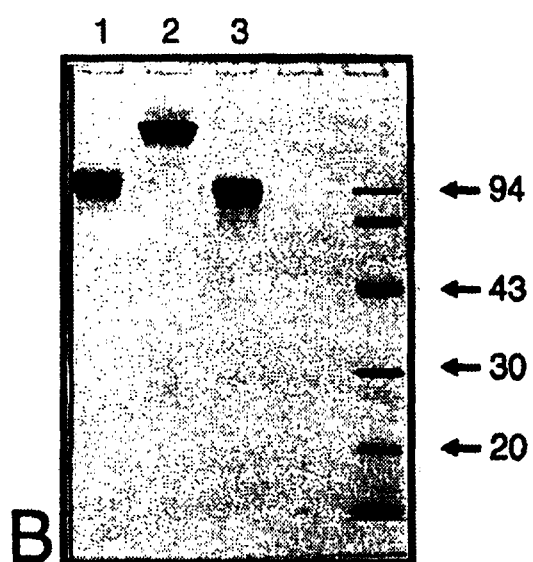


FIGURA 1B

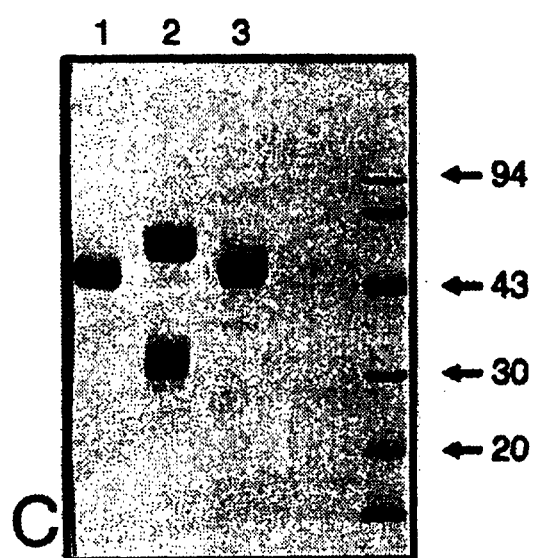


FIGURA 1C

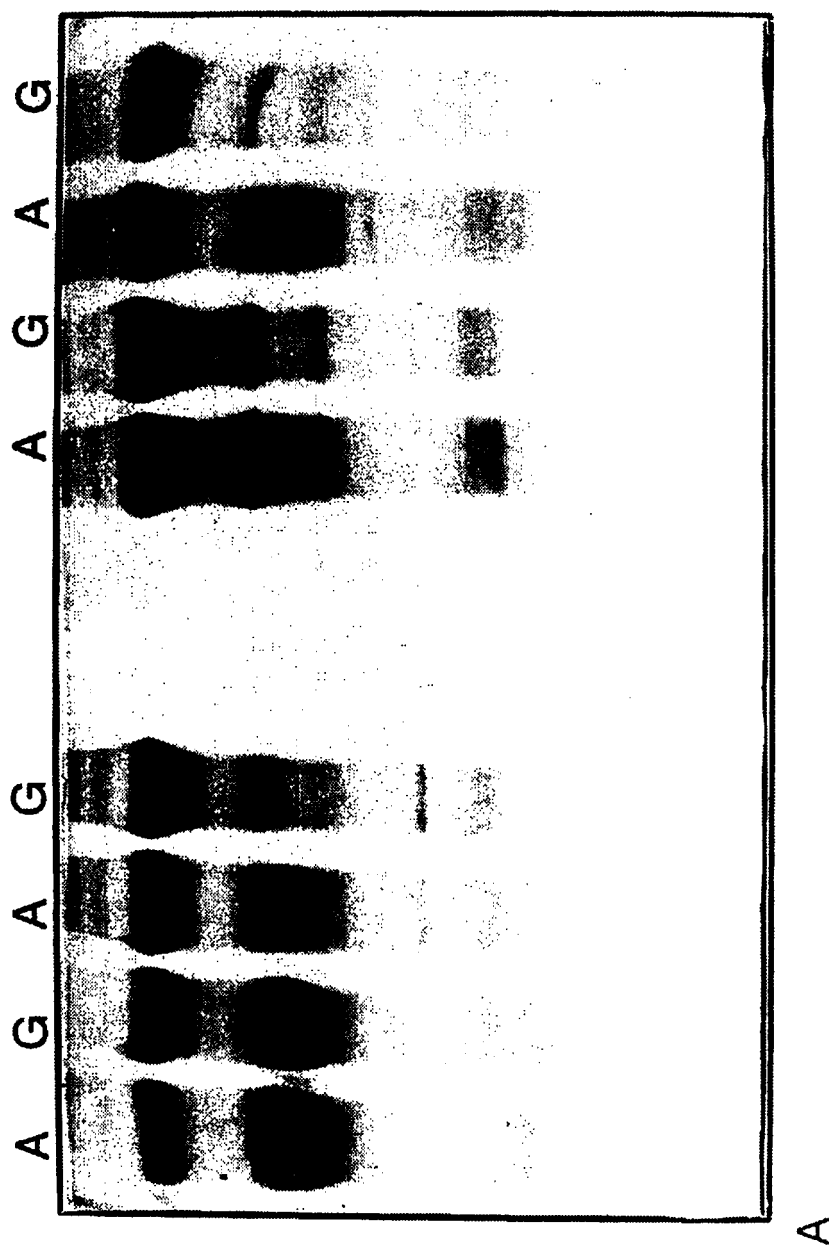


FIGURA 2A



FIGURA 2B

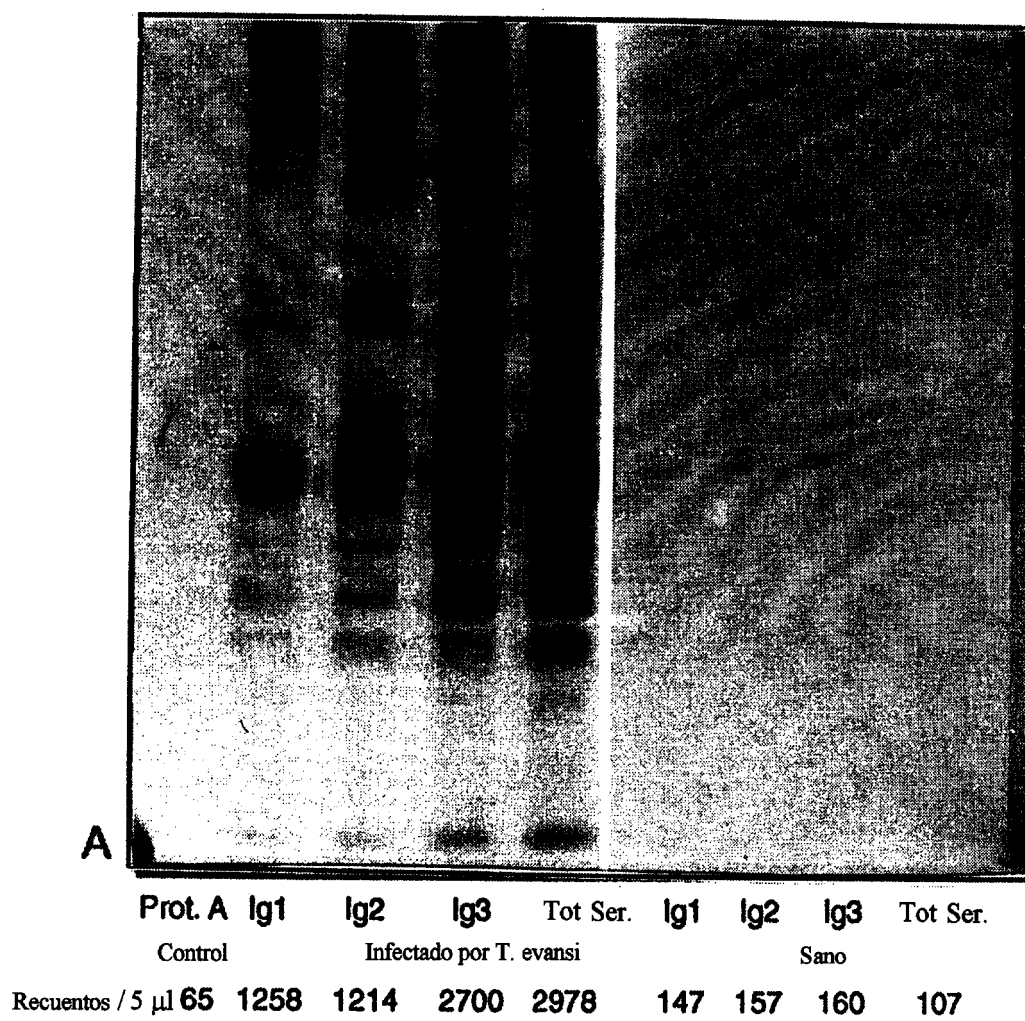


FIGURA 3A

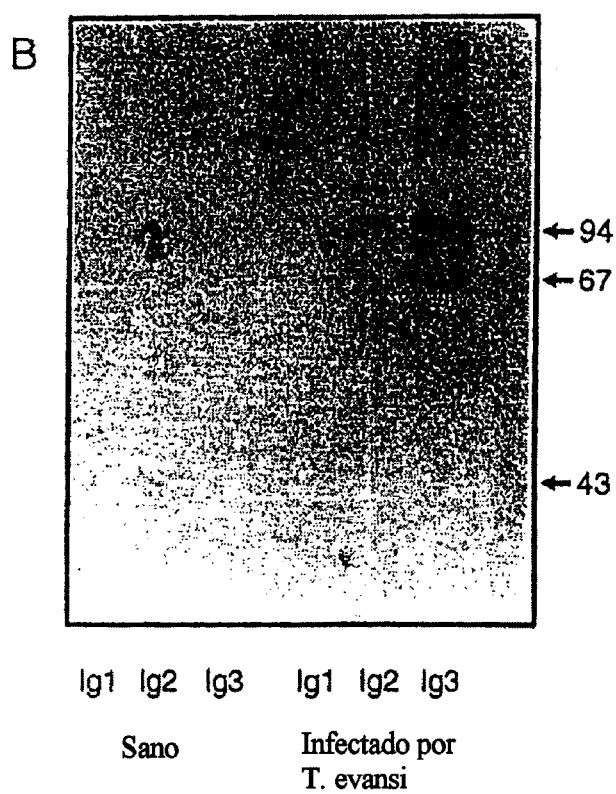


FIGURA 3B

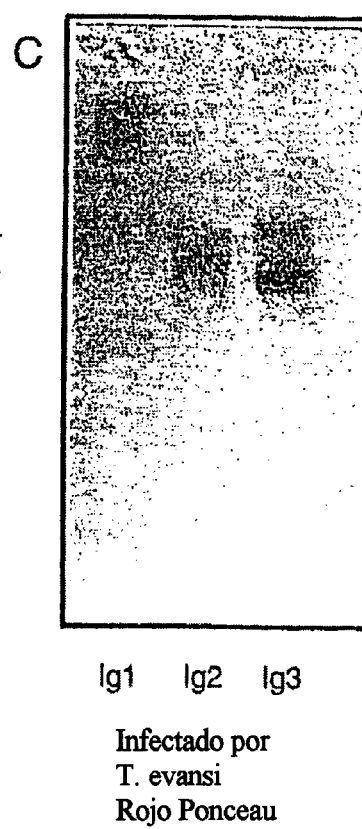


FIGURA 3C

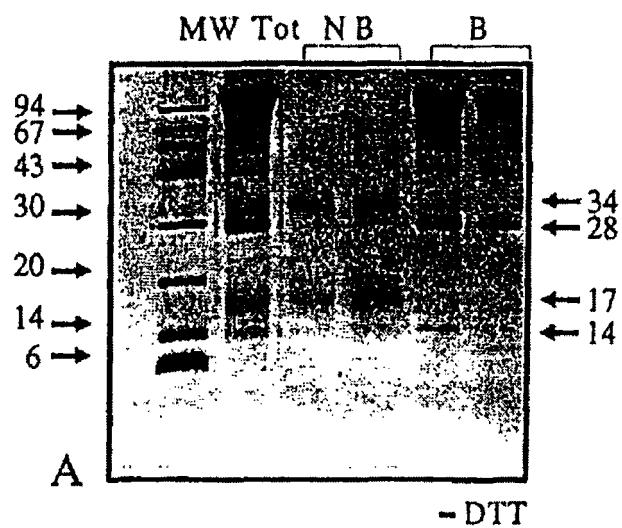


FIGURA 4A

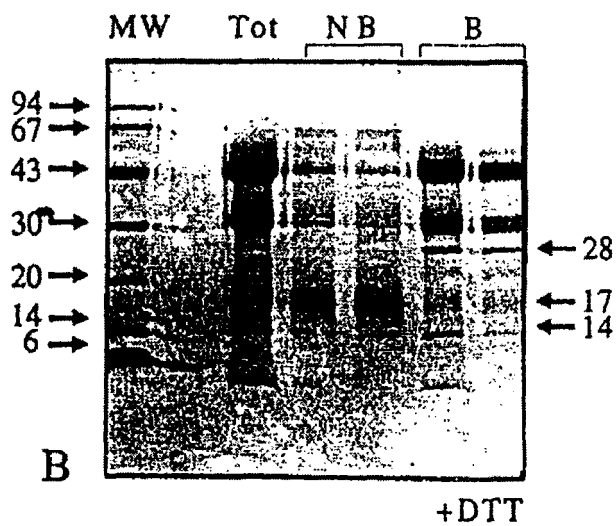


FIGURA 4B

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

Modello para la IgG3 de camello

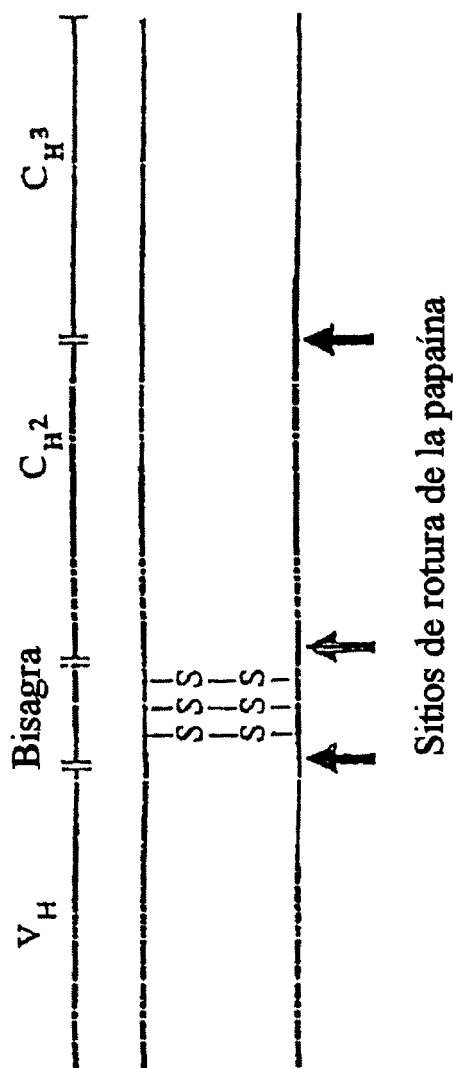


Fig. 5: Representación esquemática del modelo de IgG3 del camello

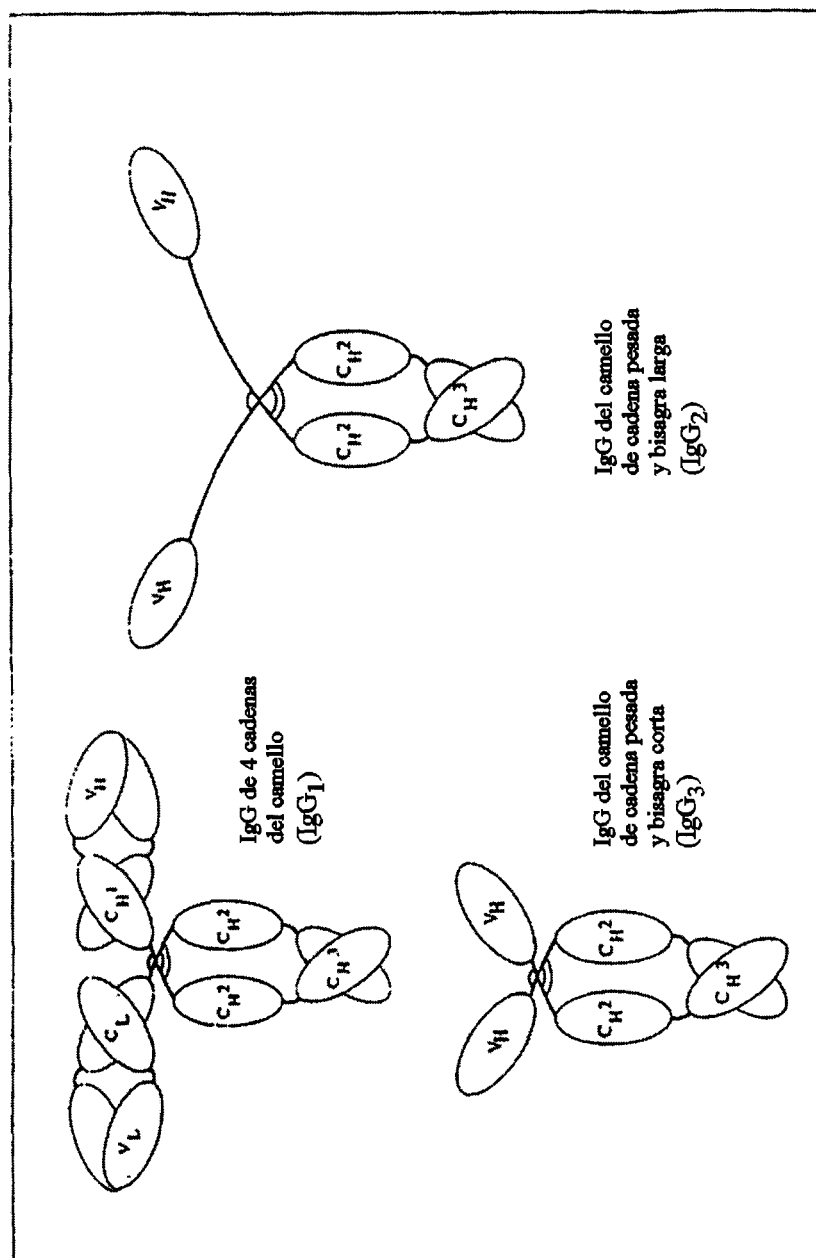


Fig 6: Una representación esquemática de las inmunoglobulinas IgG1, la supuesta IgG2 y la IgG3 del camello. El gran (Pro-X)12 de la supuesta molécula IgG2 puede modelarse en una repetición de 6 aminoácidos


```

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

DR01006 ATCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTC--GTGCG-CAGCCTCTG
DR27006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCATCTTCTTCTA
DR03006 CTCGGTGCAGACTGGAGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCACT--C-TCTG
DR11006 GTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAATGT--C-TCTG
DR24006 GTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAATGT--C-TCTG
DR16006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCACT--CCACGG
DR19006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCCCTAGACTCTCCTGTGCACT--C-TCTG
DR07006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCACT--TCTCTG
DR16006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAG--GCTCTG
DR20006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAG--CCTCTA
DR25006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAG--AAATCTCTG
DR20006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAG--TAGCCTCTG
DR21006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTAAAT--CTCTG
DR09006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTAAAT--CTCTG
DR17006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTAAAT--CTCTG
DR13006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTAAAT--CTCTG
DR02006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTAAAT--CTCTG

DR01006 GA--TACAGTAATT---GTCCCTCACTTG--GAGCTGGTATCGCCAAGTTT
DR27006 AA--TATATGCTT---GCACCTACGACAT--GACCTGGTACCGCCAAGGCT
DR03006 GA--TTCTCCTTTA---GTACCACTTGTAT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR11006 GC--TCTCCAGTA---GTACTTATTGCT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR24006 GC--TCTCCAGTA---GTACTTATTGCT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR16006 GA--TTCCGC-TCA---ATGGTTACTACAT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR19006 AC--TACACCATCA---CTGATTATTGAT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR07006 GA--TACACGACG---GTAGCTTCTGTAT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR16006 GA--TTCCCTATA---GTACCTTCTGTCT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR20006 CT--CACACCGACA---GTAGCAGCTGTAT--AGGCTGGTTCGCCAGGCT
DR25006 GA--TTGACTTTTG---ATGATTCTGACGT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR20006 GA--TTCAATTTTG---AACTTCTGTAT--GGCTGGTTCGCCAGGCT
DR21006 GAGGTACCCAGATCGTGTTCCTAAATCTTTGGCTGGTTCGCCAGGCT
DR09006 ---CAACGATACTGGGACCA-----TGGATGGTTCGCCAGGCT
DR17006 --GGCCACCTACA---GTGACTACAGTATTGGA--TGGATCGGCCAGGCT
DR13006 G-----ATACGTAT--CCT---CTATGGCTGGTTCGCCAGGCT
DR02006 GAGA----CAGTTTCAGTAGATT--TGCCATGTCTTGGTTCGCCAGGCT

```

FIG. 7A

DR01006 CCAGGAACGGAGCGCGAGTTCGTCTCCAGTATGGATCCGGATGGAAATAC
 DR27006 CCAGGCAAGGAGCGCGAATTTGTCTCAAGTATAAATATTGATGGTAAGAC
 DR03006 TCAGGAAAGCAGCGTGAGGGGGTCGCGCCATTAAAGTGGCGGTGGTAG
 DR11006 CCAGGGAGGGAGCGTGAGGGGGTCACAGCGATTAA-----CACTGATGG
 DR24006 CCAGGGAAAGGAGCGTGAGGGGGTCACAGCGATTAA-----CACTGATGG
 DR16006 CCTGGGAAGGGGCGTGAGGGGGTCGCAACAATTAATGGTGGTCG-----
 DR19006 CCAGGGAAAGGAGCGTGAAATGGTCTGAGCGATTCAAGTTGTCCGTAGTGA
 DR07006 CCAGGCAAGGAACGTGAGGGGATCGCAACTATTCTTAATGGTGGTACTAA
 DR16006 CCAGGGAAAGGAGCGTGAGGGGGTCGCGGGTATTAATAAGTGAAGGAGGTAA
 DR20006 CCAGGGAAAGGAGCGCGAGGGGGTCGCAAGTATATATTTTGGTGAATGGTGG
 DR25006 CCAGGGCATGAATGCAAAATGGTCTCAGGTATTCTGAGTGAATGGTACT--C
 DR20006 CCAGGAAATGTGTGTGAGTTGGTCTCAAGTATTTACAGTGAATGG-----
 DR21006 CCAGAGAAAGGAGCGCGAGGGGATCGCAAGTTCTTTGCACTAAAGGATGGTAA
 DR09006 CCAGGGAAAGAGTGCAGAAAGGGTCGCGCATATTACGCTGATGGTATGA--
 DR17006 CCAGGGAAAGGAGCGTGAGTGAAGTGTGCGAGCCGCTAATACTGGTGG-----
 DR13006 CCAGGGCAGGAGCGCGAGGGGGTCGCGTTTGTTCAAACGG-----
 DR02006 CCAGGGAAAGGAGTGCGAATTGGTCTCAAGCATTCAAAGTAAATGGAAGGAC

DR01006 CAAGTACA-----CATACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACC
 DR27006 AACATACG-----CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR03006 GACATACTA--CAACACATATGTCGCCGAGTCCGTGAAGGGCCGATTTCGCC
 DR11006 CAGTATCAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR24006 CAGTGTCTAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR16006 -----CGA-CGTACATACTACGCCGACTCCGTGACGGGGCCGATTTCACC
 DR19006 TACT--CGC-C-TACAGACTACGCCGACTCCGTGAAGGGGACGATTTCACC
 DR07006 -----CACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR16006 -----TACTTACTATGCCGACGCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR20006 -----TACGAATTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR25006 CATATACAAAGAGTGGAGACTATGCTGAATCTGTGAAGGGCCGAGTTACC
 DR20006 CA-AAACATACTACGTCGACC--GCA-----TGAAGGGCCGATTTCACC
 DR21006 GA-----CATTCATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR09006 -----CCTTCATTGATGAACCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR17006 -----CGACTAGTAAATCTACGTCGACTTTGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR13006 --CTGACAAT-AGTGCAATTATATGGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR02006 AACTGA-----GCGCGATTCCGTGCAAGGGCCGATTTCACC

DR01006 ATGTCCCAGGACAGCACCAGTACACAGTATTTCTGCAAAATGGACAATCT
 DR27006 ATCTCCCAAGACAGCGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAGTGAACAGCCT
 DR03006 ATCTCCCAAGACAACGCCAAGACCACGGTATATCTTGAATGAACAACCT
 DR11006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGGAAACGGTACATCTCCAGATGAACAACCT
 DR24006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGGAAACGGTATATCTCCAGATGAACAACCT
 DR16006 ATCTCCGAGACAGCCCCAAGAAATACGGTGTATCTGCAAGTGAACAGCCT
 DR19006 ATCTCCCAAGGCAACACCAAGAACACAGTGAATCTGCAAAATGAACAGCCT
 DR07006 ATCTCCCAAGACAGCACGTTGAAGACGATGTATCTGCTAATGAACAACCT
 DR16006 ATCTCCCAAGGGAATGCCAAGAAATACGGTGTATCTGCAAAATGGATAACTT
 DR20006 ATCTCCCAACTCAACGCCCAGAACACAGTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT
 DR25006 ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGATATACCTTCAAATGAACGACCT
 DR20006 ATTTCTAGAGAGAATGCCAAGAAATACATTGTATCTACAACCTGAGCGGCCCT
 DR21006 ATCTTCTTAGATAATGACAAGACCATTCTCTTACAACCTGATCGACT
 DR09006 ATCTCCGAGACAACGCCCAGAAACGTTGTCTTGGCAATGAATAGTCT
 DR17006 ATTTCCCAAGACAACGCCAAGAAATACGGTATATCTGCAAAATGAGCTTCCT
 DR13006 ATCTCCACGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGCGCAACCT
 DR02006 ATCTCCGAGACAATTCCAGGAACACAGTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT

FIG. 7B

```

DR01006 GAAACCTGAGGACACGGCGATGTATTACTGTAAAAC-A---GCCCTAC--
DR27006 GAAACCTGAGGACACGGCGATGTATTACTGTAAAAT-A---GA--TTC--
DR03006 AACCCTGAAGACACGGCTACGTATTACTGTGCGGCGG---TCCCAGCCC
DR11006 GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACTGCGCGGCAA---GACTGACGG
DR24006 GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACTGCGCGGCAA---GACTGACGG
DR16006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTACTTCTGTGCAGCAG---G-----CTC
DR19006 GACACCTGAGGACACGGCCATCTACAATTGTGCGGCAA---C-----CAG
DR07006 GAAACCTGAAGACACGGGCACCTATTACTGTGCTG-CA---GAACTAAGT
DR16006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGCGCGG-CG---GATAGTCCA
DR20006 GAAACCTGAGGACAACGCCATGTACTACTGTGCAATCA---CTGAAATTG
DR25006 GAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGCGCGGTAGATGTTTGGACCC
DR20006 CAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCG-----CC
DR21006 GAACCCGGAAGGACACTGCCGACTACTACTGCGCTGCAATCAATTAGC--
DR09006 GAGGCTTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCGAGATTG-----
DR17006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGTGCGGCGA-----CGGACCC
DR13006 GCAACCTGACGACACTGGCGTGTACTACTGTGCGGCG-----CAA
DR02006 GAAACCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCGA-----

DR01006 -----A-AC---CTGGGGGTTATTGTGGGTA-
DR27006 -----GTAC---CCGTGCCATCTCCTTGATG-
DR03006 ACTTGGGACCT-----GGCG-CCATT-----CTTGATTG
DR11006 AGATGGGGGCTTGTGATGCGAGATG66CGACCTTAGC--GACAAGGAC-6
DR24006 AGATGGGGGCTTGTGATGCGAGATG66CGACCTTAGC--GACAAGGAC-6
DR16006 GCGTTTTT-CTAGTCTTGTGGGAGCACTTC-TAGAC---TCGAAAGTAG
DR19006 TAGTTTTTACTGGTACT-----GCAC-----C---ACG-----G
DR07006 GGTGGTAGTTGTGAATTGC---CTTTCG-----TATTGACTA-----
DR16006 TGTTACATGCCGACTATGC---CCGCTCCCCGATACGAGACA6TTTTG6
DR20006 AGTGGTATGGGTGCAATTT---AAGGACTACTTTTACT---C-----G
DR25006 GGAAGGAAG--GGGGAATCGGGTTAC---CCTGGTCGGTCCAATGTGAA
DR20006 GGTGAA-----TATC---CTATTGCAGAC--ATGTGTT
DR21006 ---TG6TGGCTGGTATT-----TGGACCCGAATTACTGG-CTCTCTGTG
DR09006 ---GAAATACTGGA---CTTGTG6TGC---CCAGA-CTGG-----AG
DR17006 AAGTATATATTATAGTATC-----CTCCNNAT-----
DR13006 AAGAAGGATCGTA-----CTAGATG66C-----CGAGCCT-----
DR02006 -----CTCCCTAA--TGGACCGAATTTT

DR01006 --TGGGTANTGCCTCTG6GGGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR27006 --T-----CTG6GGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR03006 AAAAAGTATAAGTACTG6GGGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR11006 TTTGCGTATAACTACTG6GGGCG6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR24006 TTTGCGTATAACTACTG6GGGCG6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR16006 CGA-CT-ATAACTATTG6GGGCA6666ATCCAGGTCACC6TCACTCACT
DR19006 CGC-CTTATAAC6TCTG6GGGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR07006 CTGGG-----GCCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR16006 CTGGGATGATTTT-----GGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR20006 CTGGG-----GCCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR25006 GATGGTTATAACTATTG6GGGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCACT
DR20006 CGAGAT----ACG---GCGACCCG6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCAC-
DR21006 GGTGCATATGCCATCTG6GGGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCAC-
DR09006 GATACTTCGGACAG-TGGGGTCA6666GCCCAGGTCACC6TCTCCTCACT
DR17006 --TGAGTATAAGTACTG6GGGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCA--
DR13006 CGAGAATGGAACAACCTG6GGGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCTCA--
DR02006 CCAACATGGG--TGCCG6GGGCA6666ACCA6GTCACC6TCTCCT----

```

FIG. 7C

DR01006	AG----	TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR27006	AG----	TTACCCGTACGAGCTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR03006	AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC	
DR11006	AG----	TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR24006	AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC	
DR16006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR19006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR07006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR16006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR20006	----	AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR25006	---	TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR20006	---	TAGTTACCCGTACGACGAAACC6GACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR21006	---	TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC
DR09006	AGCTA6TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTC	
DR17006	-----	
DR13006	-----	
DR02006	-----	-----TA

FIG. 7D

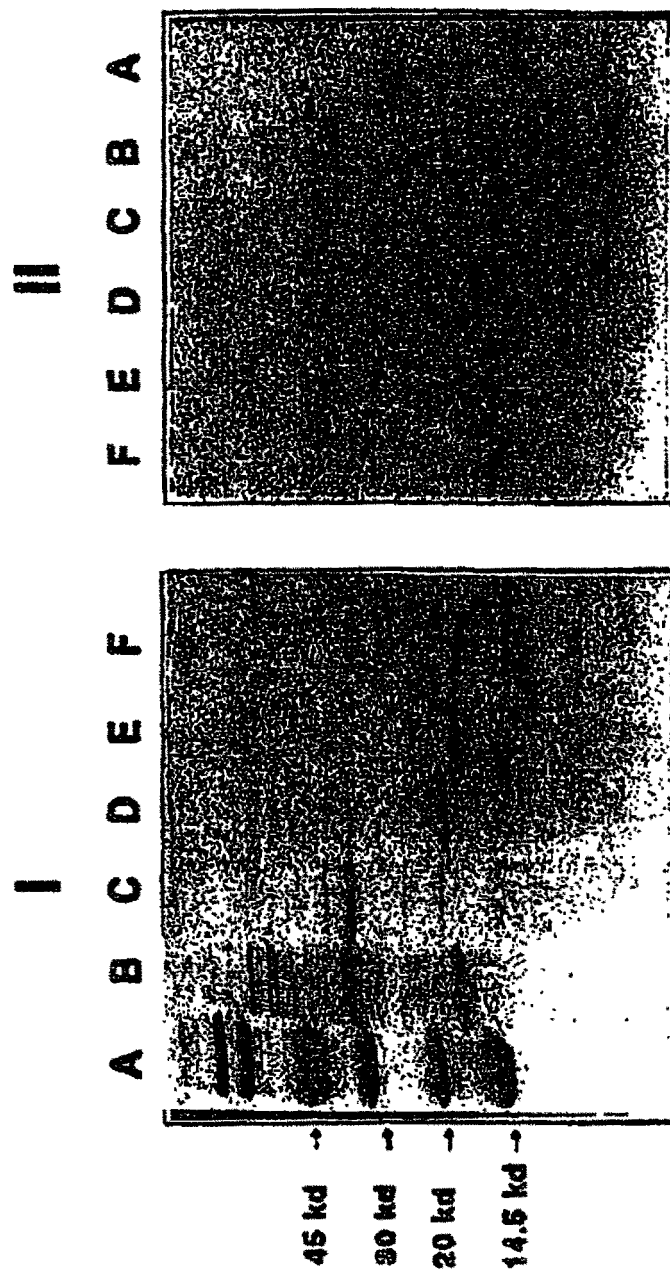


FIGURA 8B

FIGURA 8A