

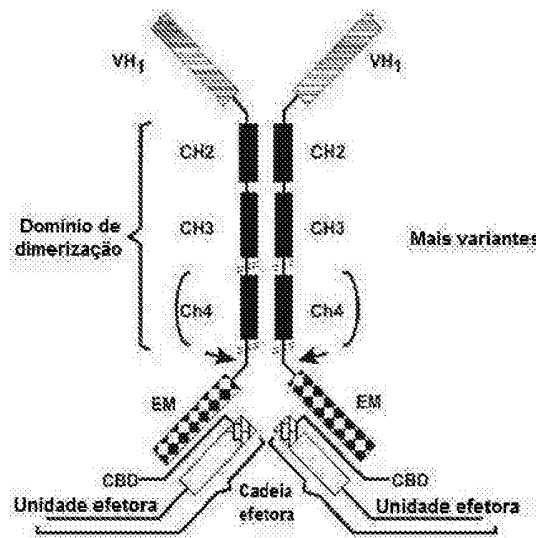
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.07.22	(73) Titular(es): ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY AND GENETICS, P.O.BOX 1738 3000 DR ROTTERDAM ROGER KINGDON CRAIG	NL GB
(30) Prioridade(s): 2004.07.22 GB 0416392 2005.06.10 GB 0511881	(72) Inventor(es): ROGER KINGDON CRAIG FRANKLIN G. GROSVELD RICHARD W. JANSSENS DUBRAVKA DRABEK	GB NL NL NL
(43) Data de publicação do pedido: 2011.04.20	(74) Mandatário: JOÃO PEREIRA DA CRUZ RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT
(45) Data e BPI da concessão: 2017.05.31 165/2017		

(54) Epígrafe: **MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE AO FABRICO DE UM REPERTÓRIO DIVERSO DE ANTICORPOS APENAS DE CADEIA PESADA FUNCIONAIS QUE SOFREM MATURAÇÃO DE AFINIDADE E ÀS SUAS UTILIZAÇÕES. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE AO FABRICO E UTILIZAÇÃO DE UM REPERTÓRIO DIVERSO DE ANTICORPOS APENAS DE CADEIA PESADA DE CLASSE ESPECÍFICA E AO FABRICO E UTILIZAÇÃO DE COMPLEXOS POLIPEPTÍDICOS MULTIVALENTES COM A FUNCIONALIDADE DA CADEIA PESADA DE ANTICORPO, DE PREFERÊNCIA A FUNCIONALIDADE DE LIGAÇÃO DE CADEIA PESADA DE ANTICORPO, A ATIVIDADE EFETORA DA REGIÃO CONSTANTE E, OPCIONALMENTE, FUNÇÕES EFETORAS ADICIONAIS.

RESUMO**"MOLECULAS DE LIGAÇÃO"****FIG. 3**

A presente invenção refere-se ao fabrico de um repertório diverso de anticorpos apenas de cadeia pesada funcionais que sofrem maturação de afinidade e às suas utilizações. A invenção também se refere ao fabrico e utilização de um repertório diverso de anticorpos apenas de cadeia pesada de classe específica e ao fabrico e utilização de complexos polipeptídicos multivalentes com a funcionalidade da cadeia pesada de anticorpo, de preferência a funcionalidade de ligação de cadeia pesada de anticorpo, a atividade efetora da região constante e, opcionalmente, funções efetoras adicionais.

A presente invenção também se refere a um método de geração de anticorpos apenas de cadeia pesada totalmente funcionais em ratinhos transgênicos, em resposta ao desafio antigénico. Em particular, a presente invenção refere-se a um método para a geração de anticorpos apenas de cadeia pesada específicos para o antigénio humano, com uma elevada afinidade, de qualquer classe ou mistura de classes e ao isolamento e expressão de domínios de ligação VH ao antigénio totalmente funcionais.

DESCRIÇÃO

"MOLECULAS DE LIGAÇÃO"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um método para a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada em ratinhos transgênicos.

Antecedentes da Invenção

Os anticorpos monoclonais ou variantes dos mesmos representarão uma alta proporção dos novos medicamentos lançados no século XXI. A terapia de anticorpo monoclonal já é aceite como uma via preferida para o tratamento de artrite reumatoide e doença de Crohn e existe um progresso impressionante no tratamento do cancro. Também estão em desenvolvimento produtos à base de anticorpos para o tratamento de doenças cardiovasculares e infecciosas. Os produtos de anticorpos monoclonais mais comercializados reconhecem e ligam um único epítipo bem definido no ligando alvo (por exemplo, $\text{TNF}\alpha$). O fabrico de anticorpos monoclonais humanos para terapia permanece dependente da cultura de células de mamíferos. A montagem de um complexo constituído por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves (o complexo H_2L_2) e os processos de glicosilação pós-

tradução subsequentes impedem a utilização de sistemas bacterianos. Os custos de produção e os custos de capital para o fabrico de anticorpos por cultura de células de mamífero são elevados e ameaçam limitar o potencial das terapias à base de anticorpos na ausência de alternativas aceitáveis. Uma variedade de organismos transgênicos é capaz de expressar anticorpos totalmente funcionais. Estes incluem plantas, insetos, galinhas, cabras e gado, mas nenhum ainda foi utilizado para o fabrico de produtos terapêuticos comercializados.

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

Os complexos de anticorpos biespecíficos são concebidos em moléculas à base de Ig capazes de ligar dois epítomos diferentes no mesmo antigénio ou em antigénios diferentes. As proteínas de ligação biespecíficas que incorporam anticorpos isolados ou em combinação com outros agentes de ligação são promissoras para modalidades de tratamento, onde as funções imunológicas humanas capturadas induzem um efeito terapêutico, por exemplo, a eliminação de agentes patogénicos (Van Spriël et al., (1999) *J. Infect. Diseases*, 179, 661-669; Tacken et al, (2004) *J. Immunol*, 172, 4934-4940; US 5487890), o tratamento do cancro (Glennie e van der Winkel, (2003) *Drug Discovery Today*, 8, 503-5100); e imunoterapia (Van Spriël et al., (2000) *Immunol*.

Today, 21, 391-397; Segal et al., (2001) J. Immunol Methods, 248, 1-6; Lyden et al., (2001) Nat. Med., 7, 1194-1201).

Os problemas de fabrico aumentam quando um produto de anticorpo biespecífico se baseia em dois ou mais complexos H_2L_2 . Por exemplo, a coexpressão de dois ou mais conjuntos de genes de cadeias pesada e leve podem resultar na formação de até 10 combinações diferentes, apenas uma das quais é o heterodímero desejado (Suresh et al., (1986) Methods Enzymol., 121,210-228).

A fim de resolver este problema foi desenvolvida uma série de estratégias para a produção em células de mamíferos de formatos de IgG biespecífica de comprimento total (BsIgG) que mantêm a função efetora da cadeia pesada. As BsIgGs requerem cadeias pesadas manipuladas de "botão e buraco" para impedir a formação de heterodímeros e a utilização de cadeias L idênticas para evitar a não complementaridade da cadeia L (Carter, (2001) Immunol. Methods, 248, 7-15). Foram também descritas estratégias de reticulação química alternativas para a produção de complexos de fragmentos de anticorpos, em que cada um reconhece antígenos diferentes (Ferguson et al., (1995), Arthritis and Rheumatism, 38, 190-200) ou a reticulação de outras proteínas de ligação, por exemplo, colectinas, aos fragmentos de anticorpos (Tacke et al., (2004) J. Immunol., 172, 4934-4940).

O desenvolvimento de diacorpos ou minianticorpos (BsAb) a que geralmente faltam as funções efetoras da cadeia pesada também supera a redundância do heterodímero. Estes incluem anticorpos de cadeia simples mínimos que incorporam sítios de ligação VH e VL (scFv), que subsequentemente dobram e dimerizam para formar um anticorpo bivalente biespecífico monovalente para cada um dos seus antígenos alvo (Holliger et al., (1993) PNAS, 90, 6444-6448; Muller et al., (1998) FEBS Lett., 422, 259-264). Num exemplo, CH1 e os domínios constantes de L foram utilizados como domínios de heterodimerização para a formação de minianticorpos biespecíficos (Muller et al., (1998) FEBS Lett., 259-264). Foi desenvolvida uma variedade de métodos recombinantes que se baseiam em sistemas de expressão de *E. coli* para a produção de BsAbs (Hudson, (1999) Curr. Opin. Immunol., 11, 548-557), contudo, parece que o custo e a escala de produção de material de anticorpo multivalente de grau clínico permanece o impedimento principal para o desenvolvimento clínico (Segal et al., (2001) J. Immunol. Methods, 248, 1-6).

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

A estrutura de imunoglobulinas é bem conhecida na técnica. A maioria das imunoglobulinas naturais compreende duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. As cadeias pesadas estão unidas uma à outra através de pontes de dissulfureto entre os domínios charneira localizados aproximadamente a meio caminho ao longo de cada cadeia pesada. A cadeia leve está associada a cada cadeia pesada do lado N-terminal do domínio charneira. Cada cadeia leve está normalmente ligada à respectiva cadeia pesada por uma ligação dissulfureto perto do domínio charneira.

Quando uma molécula de Ig está corretamente dobrada, cada cadeia dobra-se numa série de domínios globulares distintos ligados por uma sequência polipeptídica mais linear. Por exemplo, a cadeia leve dobra-se num domínio variável (V_L) e num constante (C_L). As cadeias pesadas possuem um único domínio variável V_H , adjacente ao domínio variável da cadeia leve, um primeiro domínio constante, um domínio charneira e dois ou três domínios constantes adicionais. A interação dos domínios variáveis das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) resulta na formação de uma região de ligação ao antigénio (F_v). Em geral, tanto a V_H como a V_L são necessárias para a ligação ao antigénio, embora tenha sido demonstrado que os dímeros de cadeias pesadas e os fragmentos amino-terminais retêm a atividade na ausência de cadeia leve (Jaton et al., (1968) *Biochemistry*, 7, 4185- 4195).

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

Estudos separados em domínios V_H humanos isolados derivados de bibliotecas de fagos demonstraram a ligação específica para o antigénio de domínios V_H, mas estes domínios V_H provaram ser de baixa solubilidade. Além disso, foi sugerido que a seleção de domínios V_H humanos com características de ligação específica apresentados em matrizes de fagos poderia formar blocos de construção para anticorpos manipulados (Ward et al., (1989) Nature, 341, 544-546).

Estudos utilizando outras espécies de vertebrados mostraram que os camelídeos, como consequência de mutações naturais nos genes, produziam dímeros apenas de cadeia pesada de IgG2 e IgG3 funcionais que eram incapazes de se ligar à cadeia leve, devido à ausência da região de ligação

de cadeia leve C_H1 (Hamers-Casterman et al., (1993) Nature, 363, 446-448) e que espécies, tais como o tubarão, produzem uma família de proteínas de ligação semelhantes a apenas de cadeia pesada, provavelmente, relacionada com o recetor de células T de mamífero ou a cadeia leve de imunoglobulina (Stanfield et al., (2004) Science, 305, 1770-1773).

Um aspeto caracterizante dos anticorpos apenas de cadeia pesada de camelídeos é o domínio V_H de camelídeos, que proporciona uma melhor solubilidade em relação ao domínio V_H humano. O V_H humano pode ser manipulado para melhorar as características de solubilidade (ver Davies e Riechmann, (1996) Protein Eng., 9 (6), 531-537; Lutz e Muyldermans, (1999) J. Immuno. Methods, 231, 25-38) ou a solubilidade talvez possa ser adquirida por seleção natural *in vivo* (ver Tanha et al., (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780). No entanto, quando os domínios de ligação V_H foram derivados de bibliotecas de fagos, as afinidades intrínsecas para o antigénio permanecem na gama de micromolar baixa a nanomolar elevada, apesar da aplicação de estratégias de melhoramento de afinidade que envolvem, por exemplo, aleatorização de ponto quente de afinidade (Yau et al., (2005) J. Immunol. Methods, 297, 213-224).

Os anticorpos V_H de camelídeos caracterizam-se também por uma ansa de CDR3 modificada. Esta ansa de CDR3 é, em média, mais comprida do que as que se encontram em anticorpos de não camelídeos e é uma característica que se

considera que tem uma influência importante na afinidade e especificidade globais para o antigénio, o que compensa a ausência de um domínio V_L nas espécies de anticorpos apenas de cadeia pesada dos camelídeos (Desmyter et al., (1996) Nat. Struct. Biol., 3, 803-811, Riechmann e Muyldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 23, 25-28).

Estudos estruturais recentes sobre os anticorpos de camelídeos sugerem que a diversidade de anticorpos é, em grande parte, impulsionada por processos de maturação *in vivo* com dependência em eventos de recombinação V(D)J e mutação somática (De Genst et al., (2005) J. Biol. Chem. 280 (14), 14114-14121).

Recentemente foram desenvolvidos métodos para a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada em animais transgênicos (ver W002/085945 e W002/085944). Um anticorpo apenas de cadeia pesada funcional praticamente de qualquer classe (IgM, IgG, IgD, IgA ou IgE) e derivado de qualquer mamífero (incluindo o homem) pode ser produzido a partir de animais transgênicos (ratinhos, de preferência) em consequência de um estímulo de antigénio.

O locus da cadeia pesada da imunoglobulina normal compreende uma multiplicidade de segmentos de genes V, um número de segmentos de gene D e um número de segmentos de genes J. Cada segmento de gene V codifica desde quase a extremidade N-terminal até à extremidade C-terminal de um domínio V. A extremidade C-terminal de cada domínio V é

codificada por um segmento do gene D e um segmento do gene J. O rearranjo VDJ em células B, seguido de maturação por afinidade proporciona domínios de ligação V_H que, em seguida, com domínios de ligação V_L , formam um local de reconhecimento ou ligação de antígeno.

A interação das cadeias leves e pesadas é facilitada pela região C_{H1} da cadeia pesada e pela região λ ou κ da cadeia leve.

Para a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada, o locus da cadeia pesada na linha germinal compreende segmentos de genes que codificam algumas ou todas as possíveis regiões constantes. Durante a maturação, um domínio de ligação V_H rearranjado é sujeito a excisão-união no segmento que codifica a região constante C_{H2} , para proporcionar um gene rearranjado que codifica uma cadeia pesada que carece de um domínio C_{H1} e, por conseguinte, é incapaz de se associar a uma cadeia leve de imunoglobulina.

Os anticorpos monoclonais apenas de cadeia pesada podem ser recuperados a partir de células B do baço por tecnologia padrão de clonagem ou recuperados a partir de ARNm de células B pela tecnologia de apresentação em fagos (Ward et al., (1989) Nature, 341, 544-546). Os anticorpos derivados apenas de cadeia pesada de Camelídeos ou animais transgênicos são de alta afinidade. A análise da sequência de tetrâmeros H_2L_2 normais demonstra que a diversidade resulta principalmente de uma combinação de rearranjo VDJ e

hipermutação somática (Xu e Davies, (2000) *Immunity*, 13, 37-45). A análise da sequência de ARNm de apenas de cadeia pesada expressa, quer produzida em camelídeos ou animais transgênicos, apoia esta observação (De Genst et al., (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 14114-14121).

Uma característica importante e comum das regiões V_H de camelídeos e humanos naturais é que cada região se liga como um monômero sem dependência da dimerização com uma região V_L para solubilidade e afinidade de ligação ideais. Estas características foram anteriormente reconhecidas como sendo particularmente adequadas para a produção de agentes de bloqueio e agentes de penetração no tecido.

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

A V_H humana ou V_{HH} de camelídeo produzida pela tecnologia de apresentação em fagos não tem a vantagem de características melhoradas como resultado de mutações somáticas e a diversidade adicional fornecida pela recombinação da região D e J na região da CDR3 do local de

ligação de anticorpo normal (Xu e Davies, (2000) Immunity, 13, 37-45). A V_{HH} de camélídeo, embora apresente vantagens em termos de solubilidade em relação à V_H humana, é antigénica no homem e deve ser gerada por imunização dos camélídeos ou pela tecnologia de apresentação em fagos.

A incorporação de domínios de ligação V_H tem uma clara vantagem sobre a utilização de scFv que devem ser manipulados a partir dos domínios V_H e V_L com o potencial associado de perda de especificidade e avidéz. Os domínios de ligação V_H derivados de famílias de genes relacionados, tais como os recetores de células T ou a família de imunoglobulina do tubarão também proporcionam alternativas ao scFv para a geração de moléculas de ligação bi- ou multiespecíficas. Outras proteínas de ligação que ocorrem naturalmente e os domínios das mesmas, incluindo, por exemplo, os fragmentos de recetores solúveis podem também ser utilizados.

As classes de anticorpos diferem na sua função fisiológica. Por exemplo, a IgG desempenha um papel dominante na resposta imunológica madura. A IgM está envolvida na fixação do complemento e aglutinação. A IgA é a principal classe de Ig em secreções - lágrimas, saliva, colostro, muco - e desempenha assim um papel importante na imunidade local. A inclusão de regiões constantes de cadeia pesada de classe específica quando se concebe complexos de ligação multivalentes proporciona as vantagens terapêuticas da função efetora *in vivo* dependente da funcionalidade

requerida. A manipulação de regiões efetoras individuais também pode resultar na adição ou supressão de funcionalidade (Van Dijk e van der Winkel, Curr. Opin. Chem. Biol., (2001) 5 de agosto (4), 368-374). Parece provável que a produção ideal e seleção de anticorpos da cadeia pesada apenas que compreendem domínios de ligação V_H de alta afinidade (seja humano ou de camélídeo ou de outra origem) irão beneficiar de abordagens alternativas àquelas que dependem da seleção de bibliotecas de fagos aleatorizadas que não facilitam a recombinação *in vivo* e a maturação de afinidade.

Assim, a inclusão da funcionalidade da região constante de IgA poderia proporcionar uma melhor função da mucosa contra os agentes patogénicos (Leher et al., (1999) Exp. Eye Res., 69, 75-84), enquanto a presença da funcionalidade da região constante de IgG1 proporciona melhor estabilidade sérica *in vivo*. A presença dos domínios constantes de cadeia pesada C_H2 e C_H3 proporciona a base para a dimerização estável como se vê nos anticorpos naturais e proporciona locais de reconhecimento para a glicosilação pós-tradução. A presença de C_H2 e C_H3 também permite o reconhecimento secundário do anticorpo quando são usados complexos biespecíficos e multivalentes como reagentes e agentes de diagnóstico.

Sequências isoladas da região variável apenas de cadeia pesada de Camélídeos, pré-rearranjadas foram previamente clonadas em frente de uma região de charneira e

do domínio efetor de IgG1 humana, inseridas em vetores e expressas em células COS para gerar anticorpos. Os anticorpos expressos neste ambiente *in vitro* já sofreram os processos de comutação de classe (isotipo) e de maturação de afinidade (hipermutação) *in vivo* no camelo e podem ligar-se ao antigénio (Riechmann e Muyldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231 , 25-38).

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

Continua a haver uma necessidade na técnica para gerar um repertório funcional de anticorpos apenas de cadeia pesada humana específicos para a classe e domínios de ligação apenas de cadeia pesada V_H funcionais que retêm o potencial máximo de ligação ao antigénio para utilização em diversas aplicações clínicas, industriais e de investigação.

Breve Resumo da Invenção

A presente invenção proporciona um método para a produção de um anticorpo apenas de cadeia pesada V_H que compreende:

(a) a imunização de um ratinho transgénico que expressa um locus heterólogo de cadeia pesada V_H, em que:

- (i) o locus de cadeia pesada V_H compreende uma região variável que compreende pelo menos um segmento do gene V_H de ocorrência natural, pelo menos um segmento do gene D, pelo menos um segmento do gene J e pelo menos uma região constante de cadeia pesada, e em que os segmentos dos genes V, D e J são derivados de um humano;
 - (ii) cada região constante não codifica um domínio C_{H1} ;
 - (iii) um segmento do gene V_H , um segmento do gene D e um segmento do gene J são capazes de se recombinarem para formar uma sequência de codificação de VDJ;
 - (iv) o locus de cadeia pesada V_H recombinado, quando expresso, é capaz de formar um anticorpo apenas de cadeia pesada solúvel que compreende um domínio de ligação V_H específico para o antígeno, solúvel e uma região efetora constante desprovida de um domínio C_{H1} ;
- (b) o isolamento de uma sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo apenas de cadeia pesada V_H a partir de células produtoras de anticorpo; e
- (c) a produção do anticorpo apenas de cadeia pesada V_H utilizando técnicas de ADN recombinante.

Em certas formas de realização, o método da invenção compreende ainda a clonagem de um locus V_H que codifica o domínio de ligação V_H do anticorpo apenas de cadeia pesada V_H e a expressão do domínio de ligação V_H num sistema de expressão bacteriano, de levedura, mamífero ou alternativo.

De preferência, o referido ratinho transgênico foi concebido para ter uma capacidade reduzida para produzir anticorpos que incluam cadeias leves.

De preferência, os loci de cadeia pesada de imunoglobulina endógenos ao rato são suprimidos ou silenciados. De preferência, o locus de cadeia pesada V_H compreende mais do que um segmento de gene V, mais do que um segmento do gene D e mais do que um segmento do gene J.

De preferência, o segmento de gene V foi escolhido para apresentar características de solubilidade melhoradas.

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

O locus de cadeia pesada V_H compreende uma região variável que compreende pelo menos um segmento do gene V humano, pelo menos, um segmento D humano e, pelo menos, um segmento J humano, em que um segmento do gene V, um do gene D e um do gene J são capazes de recombinar para formar uma sequência de codificação de VDJ. O locus de cadeia pesada compreende, preferivelmente, vinte ou mais segmentos do

gene D e/ou cinco ou mais segmentos do gene J. A ansa CDR3 é derivada utilizando segmentos dos genes D e J humanos.

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

A região constante da cadeia pesada do locus de cadeia pesada heteróloga é de origem humana ou de origem em vertebrados, por exemplo de origem em camelídeos. Em alternativa, a região constante pode não ter origem na cadeia pesada de imunoglobulina.

O método da invenção resulta na maturação de células B essencialmente normais. O domínio de ligação V_H pode não ter uma ansa CDR3 prolongada semelhante à dos camelídeos.

A invenção também proporciona um método de produção e seleção de anticorpos apenas de cadeia pesada que compreende os passos de:

(a) injetar um antígeno no mamífero transgênico como aqui descrito;

b) isolar uma célula ou tecido que expressa um anticorpo apenas de cadeia pesada específico para o antígeno de interesse; e

c) produzir um hibridoma a partir da célula ou tecido do passo (b) e

d) clonar opcionalmente o ARNm do anticorpo apenas de cadeia pesada do referido hibridoma para produção subsequente num sistema de expressão heterólogo tal como um sistema mamífero, vegetal, de inseto, microbiano, fúngico ou alternativo.

Os domínios de ligação V_H podem ser depois produzidos identificando e isolando um domínio V_H específico para o antigénio a partir do ARNm clonado do passo c).

Os domínios de ligação V_H podem ser também produzidos por:

(a) injeção de um antigénio no mamífero transgénico aqui descrito;

b) isolamento de uma célula ou tecido que expressa, um anticorpo apenas de cadeia pesada específico para o antigénio de interesse;

c) clonagem do locus V_H a partir do ARNm derivado a partir da célula ou tecido isolado;

d) apresentação da proteína codificada usando um fago ou

biblioteca semelhante;

e) identificação de domínio(s) V_H específico(s) para o antígeno; e

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

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os presentes inventores conseguiram ultrapassar as limitações da técnica anterior e mostraram que animais transgênicos, em particular ratinhos, podem ser gerados utilizando "micro loci" para produzir anticorpos apenas de cadeia pesada específicos para a classe, ou uma mistura de diferentes classes de anticorpos apenas de cadeia pesada que são segregados por plasma ou por células B. Estes podem ser então utilizados para gerar um fornecimento fidedigno de anticorpo apenas de cadeia pesada específicos para a classe utilizando tecnologia de hibridoma estabelecida ou como uma fonte de domínios de ligação apenas de cadeia pesada V_H funcionais, de preferência um domínio de ligação apenas de cadeia pesada V_H solúvel, que são livres de funções efetoras, mas que retêm a função de ligação.

Os anticorpos apenas de cadeia pesada que podem ser gerados pelo método da invenção mostram afinidade de ligação elevada, que resulta de rearranjos dos segmentos

dos genes V, D e J e de mutações somáticas, geralmente na ausência de uma ansa CDR3 aumentada. Essencialmente, observa-se maturação de células B normais com níveis elevados de anticorpo apenas de cadeia pesada presentes no plasma isolado (desde que o domínio C_H1 tenha sido eliminado de todas as classes de anticorpos presentes no locus recombinante). A maturação de células B e a secreção de dímeros (por exemplo, IgG) ou multímeros (por exemplo, IgM) montados não tem nenhuma dependência em relação à presença ou expressão de genes de cadeia leve.

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

Mostra-se que os ratinhos transgênicos podem ser programados para produzir as classes preferidas de

anticorpos apenas de cadeia pesada em resposta ao desafio com o antígeno, por exemplo, apenas IgG contra apenas IgM ou, por exemplo, misturas de IgA, IgG e IgM.

Os inventores descreveram anteriormente (ver WO02/085945 e WO02/085944) a geração de ratinhos transgênicos que expressam um locus mínimo de região constante de cadeia pesada de IgG humana desprovido do exão de C_{H1} e ligado por segmentos D e J humanos com dois genes de V_{HH} de lama. Estes produzem anticorpos apenas de cadeia pesada de IgG específicos para o antígeno, de alta afinidade, funcionais quando desafiados com antígeno. Podem ser obtidas misturas de classes de anticorpos apenas de cadeia pesada (IgM e IgG) por troca de classe *in vivo*, através da utilização de construções de genes que incorporam as regiões constantes da cadeia pesada em tandem (desde que a todos os genes da região constante careçam de um domínio C_{H1} e, quando presente, um domínio C_{H4}).

Os aperfeiçoamentos aqui descritos mostram que um ratinho construído com o mesmo locus da região constante de IgG ligado por segmentos D e J humanos com dois genes de V_{HH} de lama e um locus de região constante de IgM humana desprovido de um exão de C_{H1} ligados pelos mesmos segmentos de genes D e J humanos com dois segmentos de genes de V_{HH} de lama, também produz um anticorpo apenas de cadeia pesada de IgM de elevado peso molecular (multimérico) e um anticorpo apenas de cadeia pesada de IgG (dímero). Surpreendentemente, a maturação de células B

essencialmente normal e a produção de anticorpos é dependente da ausência total de sequências C_{H1} de cada região constante de cadeia pesada presente no locus transgênico. Além disso, não existe qualquer requisito para a remoção do exão C_{H4} , se presente.

Assim, por exemplo, um animal transgênico que tem um locus de cadeia pesada de IgM humana com um exão de C_{H1} funcional ligado pelos mesmos segmentos dos genes D e J humanos a dois segmentos do gene V de lama, e o locus da região constante de cadeia pesada de IgG desprovido do exão de C_{H1} ligado pelos mesmos segmentos dos genes D e J humanos a dois segmentos do gene V de lama, produz níveis muito baixos de anticorpo apenas de cadeia pesada e não mostra nenhuma evidência para a maturação de células B.

Outros domínios efetores, que incluem o domínio C_{H4} , podem ser incorporados ou não, consoante desejado, para introduzir ou eliminar características efetoras do anticorpo apenas de cadeia pesada resultante.

Os inventores descobriram que a expressão produtora de anticorpo (isto é, a maturação de células B) pode resultar da utilização de qualquer segmento do gene V presente na construção. O isolamento e a sequenciação do ARNm do anticorpo derivado de células B mostram que ocorre recombinação dos segmentos dos genes D e J para gerar diversidade de CDR3. A comparação das sequências dos domínios V_H resultantes revela mutações somáticas, o que

indica que ocorreram eventos de maturação de afinidade nos segmentos dos genes D e J recombinados e também no domínio V_H do ARNm do anticorpo expresso resultante.

As construções preferidas incorporam segmentos do gene V selecionados para uma melhor solubilidade e ligados a um grupo de cadeia D e J para recombinação e geração de CDR3. De preferência, as sequências de VDJ estão ligadas ao(s) domínio(s) efetor(es) constante(s) de eleição, em tandem, cada um desprovido de um exão de C_H1 .

Os domínios V_H resultantes não podem compreender uma ansa CDR3 alargada semelhante à dos camelídeos. Isto resulta num domínio V_H que exibe diversidade de CDR3 e maturação de afinidade operacionalmente ligado a uma região constante efetora. Esta última assegura a secreção funcional e, opcionalmente, montagem no rato parental.

Estas observações têm implicações importantes para a manipulação aperfeiçoada e simplificada de anticorpos apenas de cadeia pesada específicos para a classe e a derivação de domínios V_H solúveis de alta afinidade, que incorporam a maturação da afinidade através da mutação somática. A incorporação de funções efetoras selecionadas da região constante da cadeia pesada (desprovida de C_H1) ou misturas das mesmas permite a produção de qualquer classe de anticorpos apenas de cadeia pesada ou qualquer mistura de anticorpos apenas de cadeia pesada sem o requisito de manipulação adicional dos

anticorpos. Os domínios V_H podem ser expressos por si só ou em sistemas bacterianos ou de outros microrganismos ou como domínios efetores que incorporam anticorpos apenas de cadeia pesada funcionais segregados por hibridomas ou células transfectadas em cultura. Os anticorpos ou domínios de ligação V_H de origem humana têm uma grande gama de aplicações na área da saúde como medicamentos, agentes de diagnóstico e reagentes, com aplicações agrícolas, ambientais e industriais paralelas.

As moléculas efetoras de cadeia pesada podem ser manipuladas para serem livres de domínios funcionais, por exemplo os domínios C_{H4} da extremidade carboxi-terminal, desde que a manipulação não afete os mecanismos secretores impedindo a montagem da superfície da célula e, consequentemente, a maturação de células B. Os exões de C_{H1} isolados são suprimidos do locus heterólogo ou estão ausentes do locus. Podem ser manipuladas características adicionais no locus, por exemplo, para melhorar a glicosilação ou adicionar funções.

De preferência, o locus heterólogo, quando expresso, é capaz de formar moléculas de IgA, IgE, IgG, IgD ou IgM funcionais, ou isotipos das mesmas. Podem ser também produzidas classes de anticorpos individuais ou misturas de classes de anticorpos ou isotipos das mesmas.

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

misturas de anticorpos apenas de cadeia pesada dependendo da(s) classe(s) de anticorpos requerida, com a maturação das células B essencialmente normais. A utilização de segmentos dos genes V, D e J humanos, que compreendem segmentos do gene V selecionados aleatoriamente, ou selecionados para solubilidade aumentada, irá produzir anticorpos apenas de cadeia pesada humana funcionais.

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

Lócus de Cadeia Pesada Heteróloga

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

Um "lócus de cadeia pesada V_H ", no contexto da presente invenção refere-se a um micro-lócus mínimo que codifica um domínio V_H que compreende um ou mais segmentos do gene V, um ou mais segmentos do gene D e um ou mais

segmentos do gene J, operacionalmente ligados a uma ou mais regiões efetoras de cadeia pesada (cada uma desprovida de um domínio C_{H1}). De preferência, a fonte principal de variabilidade do repertório de anticorpos é a região CDR3 formada pela seleção de segmentos dos genes D e J pelas junções V-D e D-J.

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

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

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

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

De preferência, o locus de cadeia pesada V_H compreende de dois a vinte (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 ou 20) ou mais segmentos do gene J (normalmente 6 segmentos do gene J humano).

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

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

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

O segmento do gene V deve ser capaz de recombinação com um segmento do gene D, um segmento do gene J e uma região (efetora) constante de cadeia pesada (que pode compreender vários exões mas exclui um exão de C_H1) de acordo com a presente invenção para gerar um anticorpo

apenas de cadeia pesada V_H quando o ácido nucleico é expresso.

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

Um "domínio V_H " no contexto da presente invenção refere-se a um produto de expressão de um segmento do gene V quando re combinado com um segmento do gene D e um segmento do gene J, como definido acima. O domínio V_H , como aqui utilizado, permanece em solução e é ativo num meio fisiológico, sem a necessidade de qualquer outro fator para a manter a solubilidade. De preferência, a capacidade do domínio V_H solúvel para ligar o antígeno foi melhorada por recombinação de VDJ e mutação somática. Não há nenhuma dependência em relação à presença ou ausência da ansa CDR3 alargada peculiar para as espécies camelídeas. O domínio V_H é capaz de se ligar ao antígeno como um monómero e, quando combinado com as regiões constantes efetoras, pode ser produzido em formas monoespecíficas, biespecíficas, multiespecíficas, bivalentes ou multivalentes, dependendo da escolha e da manipulação das moléculas efetoras utilizadas (por exemplo, IgG, IgA IgM, etc) ou de mecanismos alternativos de dimerização e multimerização. Qualquer probabilidade de se ligarem com um domínio V_L , quando expresso como parte de um complexo de anticorpo apenas de cadeia pesada solúvel, foi eliminada

pela remoção do exão de C_H1 (ver Sitia et al., (1990) Cell, 60, 781-790). O domínio V_H sozinho também pode ser manipulado com diferentes domínios de proteínas para produzir proteínas de fusão para fins terapêuticos e de diagnóstico direcionados, por exemplo, com toxinas, enzimas e agentes de imagem.

O locus de cadeia pesada heteróloga compreende uma região de ADN que codifica uma região constante da cadeia pesada que proporciona funções efetoras *in vivo* (por exemplo, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD ou isotipos das mesmas).

A região constante da cadeia pesada

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

Cada região constante da cadeia pesada compreende essencialmente, pelo menos, um gene da região constante de cadeia pesada, que é expresso sem um domínio C_H1 funcional de modo que possa ocorrer a geração de anticorpos apenas de cadeia pesada. Cada região constante da cadeia pesada também pode compreender um ou mais exões da região constante da cadeia pesada adicionais, os quais são selecionados de entre o grupo que consiste em C δ , C γ ₁₋₄, C μ ,

C ϵ e C α_{1-2} com a condição de que os genes da região constante de cadeia pesada adicionais também não expressem um domínio C $H1$ funcional. Os segmentos dos genes da região constante da cadeia pesada são selecionados dependendo da classe preferida ou mistura de classes de anticorpos necessária. Opcionalmente, o locus de cadeia pesada heteróloga é deficiente em C μ e C δ .

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

A expressão da totalidade ou parte de um locus C γ da cadeia pesada heteróloga desprovido de C $H1$ irá produzir opcionalmente alguns ou todos os isotipos de IgG, dependendo dos isotipos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 presentes no locus de IgG heteróloga. Em alternativa, as cadeias pesadas podem conter genes de C ϵ . A molécula de IgE resultante também pode ser utilizada em terapia.

Alternativamente, podem ser obtidas misturas selecionadas de anticorpos. Por exemplo, a IgA e a IgM

podem ser obtidas quando a região constante da cadeia pesada compreende um gene de $C\alpha$ e um gene de $C\mu$.

A região constante da cadeia pesada pode ser de origem humana, em particular quando o anticorpo de cadeia pesada é para ser utilizado para aplicações terapêuticas em seres humanos. Quando os anticorpos de cadeia pesada são para ser usados para fins de diagnóstico ou veterinários, a região constante da cadeia pesada é de preferência derivada do organismo, vertebrado ou mamífero alvo ou sobre a qual o diagnóstico ou terapia veterinária vai ser executada.

Quando expressa, a região constante da cadeia pesada carece de um domínio C_{H1} funcional. O exão de C_{H1} e, opcionalmente, as regiões constantes $C\mu$ e $C\delta$, podem ser mutadas, suprimidas ou substituídas. De preferência, o exão de C_{H1} é suprimido. A presença, por exemplo, de IgM com um domínio C_{H1} funcional inibe a maturação das células B e, por conseguinte, limita a expressão produtiva da IgG apenas da cadeia pesada (desprovida de C_{H1}) no mesmo locus, já que a maturação de células B está inibida.

O "exão da região constante de cadeia pesada" (exão de " C_H ") tal como aqui definido inclui as sequências de ocorrência natural de um vertebrado, mas especialmente exões de C_H de mamíferos. Isto varia de um modo específico para a classe. Por exemplo, a IgG e a IgA são naturalmente desprovidas de um domínio C_{H4} . O termo "exão de C_H " também inclui dentro do seu âmbito, os derivados, homólogos e

fragmentos dos mesmos, na medida em que o exão de C_H seja capaz de formar um anticorpo apenas de cadeia pesada funcional, como aqui definido, quando é um componente de uma região constante de cadeia pesada.

Opcionalmente, quando presente, o C_{H4} ou outros domínios funcionais podem ser manipulados ou suprimidos dentro do transgene, desde que esse processo não iniba o processo de secreção intracelular, a maturação de células B ou a atividade de ligação do polipéptido de anticorpo resultante.

Ratos

O mamífero transgênico utilizado nos métodos da invenção é um rato.

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

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

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

O rato transgênico pode ser concebido para ter uma capacidade reduzida de produzir anticorpos que incluam cadeias leves.

As células produtoras de anticorpos podem ser derivadas de ratos transgênicos de acordo com a presente invenção e utilizadas, por exemplo, na preparação de hibridomas para a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada, como aqui definidos. Adicional ou alternativamente, as sequências de ácidos nucleicos podem ser isoladas de ratos transgênicos de acordo com a presente invenção e utilizadas para produzir anticorpos apenas de cadeia pesada do domínio V_H ou complexos biespecíficos/bifuncionais dos mesmos, utilizando técnicas de ADN recombinante que são familiares para os peritos na técnica.

Alternativa ou adicionalmente, os anticorpos apenas de cadeia pesada específicos para o antígeno podem ser gerados por imunização de um rato transgênico de acordo com a presente invenção.

Assim, num outro aspeto, a presente invenção proporciona um método para a produção de anticorpos apenas de cadeia pesada através da imunização de um rato transgénico de acordo com a presente invenção com um antigénio.

Anticorpos apenas de cadeia pesada e seus fragmentos

O domínio específico de ligação apenas de cadeia pesada para o antigénio, ou seja, um domínio de ligação V_H , é expresso pelo locus V_H como consequência da recombinação entre segmentos dos genes V, D e J únicos, seguido posteriormente de mutação somática. De acordo com este aspeto da invenção, os loci V_H podem ser clonados a partir de, por exemplo, o ARNm isolado a partir de uma célula produtora de anticorpos de um rato transgénico imunizado, como descrito acima. As sequências clonadas podem ser, em seguida, apresentadas usando um fago (Ward et al., (1989) Nature, 341, 544-546) ou bibliotecas de apresentação semelhantes, por exemplo, utilizando sistemas à base de levedura (Boder e Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15, 553-7) e domínios de ligação V_H específicos para o antigénio identificado. Os domínios de ligação de cadeia pesada específicos para o antigénio podem ser então fabricados isoladamente ou como proteínas de fusão em sistemas de expressão escaláveis bacterianos, de levedura ou alternativos. As sequências que codificam os domínios de

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

Por conseguinte, a invenção também proporciona um método de produção de um domínio de ligação V_H que compreende os passos de:

- a) isolar uma célula ou tecido que expressa um anticorpo apenas de cadeia pesada específico para o antígeno de interesse (de preferência um anticorpo apenas de cadeia pesada específico para o antígeno, solúvel de interesse);
- b) clonar a sequência que codifica o domínio de ligação V_H a partir do ARNm derivado da célula ou tecido isolado;
- c) apresentar a proteína codificada utilizando um fago ou biblioteca semelhante;
- d) identificar os domínios de ligação V_H específicos para o antígeno, e
- e) expressar os domínios de ligação V_H isoladamente ou como uma proteína de fusão em sistemas de expressão bacterianos, de levedura, mamíferos ou alternativos.

Alternativamente, os fragmentos que contêm o domínio V_H podem ser gerados de anticorpos apenas de cadeia pesada da invenção utilizando tecnologia de clivagem enzimática ou química e separação subsequente do fragmento que contém o domínio V_H dos outros produtos de clivagem.

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

Os sistemas de produção para anticorpos apenas de cadeia pesada que incorporam regiões efetoras incluem as células de mamífero em cultura (por exemplo, células CHO), plantas (por exemplo, milho), cabras, coelhos, gado, ovelhas, galinhas e larvas de insetos transgênicos adequados para tecnologia de criação em massa. Outros sistemas de produção, incluindo a infecção por vírus (por exemplo, baculovírus em larvas de insetos e linhas celulares) são alternativos à abordagem de cultura de células e linhas germinais. Outros métodos de produção serão também familiares aos peritos na técnica. Quando há um requisito para a montagem de IgA ou IgM apenas de cadeia pesada, a coexpressão de uma "cadeia J" é benéfica. Os métodos adequados para a produção de domínios de ligação V_H por si só são conhecidos na técnica. Por exemplo, os

domínios de ligação V_H de camelídeos foram produzidos em sistemas bacterianos e os homodímeros apenas de cadeia pesada de camelídeos foram produzidos em hibridomas e células de mamífero transfectadas (ver Reichmann e Muyltermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38).

Encontram-se também bem estabelecidos métodos para a expressão de domínios de ligação V_H humanos manipulados derivados usando tecnologia de apresentação em fagos (Tanha et al., (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780 e referências nele contidas).

Foi demonstrado que as larvas de insetos de linhas de moscas transgênicas produzem fragmentos funcionais de anticorpos apenas de cadeia pesada na hemolinfa com características indistinguíveis do mesmo anticorpo produzido por células de mamíferos (PCT/GB2003/0003319).

O anticorpo produzido apenas de cadeia pesada pelo método da invenção ou um fragmento do mesmo como aqui descrito pode ser utilizado como um reagente de ligação intracelular ou uma abzima.

O anticorpo de cadeia simples ou o domínio de ligação V_H específico para o antigénio produzido de acordo com o método da invenção pode ser utilizado como um inibidor de enzima ou um bloqueador de recetor.

Um domínio V_H fundido com uma molécula efetora pode ser utilizado como um agente terapêutico, agente de imagem, agente de diagnóstico, abzima ou reagente.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1: mostra a estratégia para a geração de ratinhos transgênicos que expressam um locus de IgG e a geração funcional de anticorpos apenas de cadeia pesada e domínios V_H como uma consequência do desafio com antígeno.

Figura 2: mostra a estratégia para a geração de ratinhos transgênicos que expressam um locus de IgM e a geração funcional de anticorpos apenas de cadeia pesada e domínios V_H como uma consequência do desafio com antígeno.

Figura 3: mostra a estratégia para a geração de ratinhos transgênicos que expressam um locus de IgA e a geração funcional de anticorpos apenas de cadeia pesada e domínios V_H como uma consequência do desafio com antígeno.

Figura 4: Alinhamento da sequência dos produtos de PCR obtidos a partir do ADNc de medula óssea utilizando iniciadores V_{HH1} e V_{HH2} em combinação com o iniciador Cy2 humano a partir de ratinhos que contém um locus com regiões constantes que têm uma mutação de excisão-união de camelídeo para remover o CH1. Os resultados mostram que o CH1 não é removido.

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

Figura 9: Plano de imunização dos ratinhos e pesquisa de anticorpos para a geração de IgG apenas de cadeia pesada contra *E.coli* HSP70.

Figura 10: Análise de citometria de fluxo e resultados de imuno-histoquímica para células do baço derivadas de ratinhos transgênicos.

Figura 11: Resultados da análise de ELISA de ratinhos transgênicos imunizados com DKTP e análise da sequência da biblioteca de anticorpos resultante.

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

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

Figura 14: Resultados da análise de transferência de Western de soros de linhas de ratinhos transgênicos.

Figura 15: Fracionamento do tamanho de IgM humana misturada com uma IgM de cadeia simples humana produzida pelos ratinhos com lócus de IgM mais IgG.

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

Técnicas Gerais

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

Harlow & Lane, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y , é referido para as técnicas imunológicas convencionais.

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

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

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

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

vaccinia.

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

Exemplo 1

Em experiências preliminares foram preparados ratinhos transgênicos para expressar um locus de cadeia pesada, em que dois exões de V_{HH} de lama foram ligados aos segmentos de diversidade da cadeia pesada humana (D) e de união (J), seguidos pelos genes das regiões constantes humanas $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma 2$, $C\gamma 3$ e 3'LCR da imunoglobulina de cadeia pesada humana. Os genes das $C\gamma 3$ $C\gamma 2$ humanas contêm uma mutação de excisão-união de G para A. A presença do sítio Frt possibilitou a geração de uma única cópia de rato transgênico a partir de uma matriz transgênica de múltiplas cópias por recombinação mediada por Flp. No entanto, as sequências do locus transgênico com uma mutação de excisão-união de G para A mostraram excisão-união aberrante mas remoção incompleta de CH1 (Figura 4).

Construções

Para ultrapassar este problema, uma biblioteca genômica de cosmídeos foi pesquisada quanto a clones que contenham os genes de VH, utilizando métodos padrão. Uma (ou mais) VHs de linha germinativa diferente foi escolhida aleatoriamente com base na sua sequência (cinco classes de gêneros, no caso das VHs humanas). Foram introduzidos codões de aminoácidos hidrofílicos nas posições 42, 49, 50 e 52 de acordo com a numeração IMGT (Lefranc et al. (1999)). Os genes de VH foram combinados num vetor BAC por procedimentos padrão, tais como clonagem direta usando ligantes feitos à medida ou recombinação homóloga.

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

Usando técnicas padrão, os genes de C γ 3 e C γ 2 foram subclonados separadamente no vetor pFastBac (Invitrogen). De modo semelhante, qualquer uma das outras regiões constantes de Ig pode ser clonada a partir destes BACs (IgA, IgE). Uma supressão completa do exão de CH1 foi

realizada por recombinação homóloga (Imam et al.(2001)), usando as sequências que flanqueiam o exão de CH1 de cada região constante. Um local *frt* poderia ser opcionalmente introduzido na frente da região de troca de *C_μ* para permitir a geração loci de uma única cópia a partir de loci de múltiplas cópias por tratamento com a recombinase *flp* *in vivo* por meios padrão, por exemplo por meio de cruzamento de ratinhos *rosa-flp* (Figura 5).

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

Outras construções poderiam ser então criadas.

Locus apenas de IgM

A fim de obter a construção de IgM (Figura 6), um ou mais genes de VHs, seguidos por segmentos de cadeia pesada D e J humana e *C_μ*, foram clonados num BAC. Ver acima para a metodologia. Neste caso, apenas a região de *C_μ* foi clonada no BAC final.

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

A fim de se obter a construção de IgM mais IgG (Figura 7), um ou mais genes de VHs, seguidos por segmentos

de cadeia pesada D e J humana, C μ (sem CH1 mas com o exão de CH4), (C δ opcional) e os genes de C γ 2 e C γ 3 humanos modificados e 3'LCR foram clonados no BAC. A fim de gerar um locus apenas de IgG, foram introduzidos locais loxP durante os passos de clonagem padrão (descrito acima) e o BAC é crescido na estirpe de E. coli 294 Cre (Buscholz et al.) e a recombinação mediada por cre produz bactérias que produzem um locus apenas de IgG. Ver acima para mais detalhes sobre a construção.

Locus de IgM mais IgG (C δ é opcional)

A fim de se obter a construção de IgM mais IgG (Figura 8), um ou mais genes de VHs, seguidos por segmentos de cadeia pesada D e J humana, C μ (sem CH1 e CH4), (C δ opcional) e os genes de C γ 2 e C γ 3 humanos modificados e 3'LCR foram clonados num BAC. A fim de gerar um locus apenas de IgG, foram introduzidos locais loxP durante os passos de clonagem padrão (descrito acima) e o BAC é crescido na estirpe de E. coli 294 Cre (Buscholz et al.) e a recombinação mediada por cre produziu bactérias que produzem um locus apenas de IgG.

Ratos transgênicos, crescimento e genotipagem

O BAC final foi introduzido em ratinhos transgênicos por microinjeção padrão de ovos fertilizados ou através da tecnologia de transfecção de células estaminais embrionárias.

Os loci transgênicos foram verificados quanto à integridade e ao número de cópias por análise de transferência de Southern do ADN da cauda (Southern 1975), utilizando sondas da extremidade 5' e 3' do locus. Os fundadores foram criados como linhas no ambiente μ MT-/- . A genotipagem foi realizada por análise de PCR padrão utilizando iniciadores para cada uma das diferentes regiões do locus. A análise da sequência dos produtos de RT-PCR derivados de ADNc BM de ratinhos transgênicos onde todo o exão de CH1, tanto da C γ 2 como da C γ 3, foi suprimido (um com (linhas HLL) e outra sem os genes de C μ e C δ , mostrou que os loci transgênicos não só são capazes de recombinação VDJ, mas que as transcrições de IgG se assemelham às encontradas nos HCABs de lama e camelo.

Imuno-histoquímica

Os baços foram embebidos em composto OCT. Secções criostáticas de 5 μ m congeladas foram fixadas em acetona e marcadas de forma simples ou dupla, como descrito anteriormente (Leenen et al. 1998). Os anticorpos monoclonais anti-B220/RA3-6B2, anti-CD11c/N418 (Steinman et al., 1997), foram aplicados como sobrenadantes de cultura de hibridomas. A IgG anti-humana e a IgM anti-humana de cabra acopladas a peroxidase foram da Sigma. Os reagentes da segunda etapa foram Ig anti-rato (DAKO, Glostrup, Dinamarca) ou Ig anti-hamster (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) de cabra marcadas com

peroxidase e Ig anti-rato de cabra com fosfatase alcalina (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, EUA).

A Figura 10 mostra a análise imuno-histoquímica de secções congeladas de 5µm de baços de $\mu\text{MT}^{-/-}$, WT e ratinhos transgênicos HLL e HLL-MD no ambiente $\mu\text{MT}^{-/-}$. As secções foram coradas com anti-B220 (azul) para as células B e anti-CD11c/N418 (castanho) para as células dendríticas. As setas indicam a localização de pequenos aglomerados de células B.

Análises de Citometria de Fluxo

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

No lado esquerdo da figura está uma representação da recombinação Flp *in vivo* por meio de cruzamento de linhas da HLL com uma linha transgênica FlpeR e que apoia os dados de varrimento FACS sobre as células do baço do recombinante, o que mostra o resgate de células B como pode ser visto nas linhas HLL-MD originais geradas diretamente. À direita está uma representação da recombinação Cre *in vivo* por meio de cruzamento da linha transgênica Cag Cre e os dados FACS em células do baço do recombinante de cópia única.

Imunização e produção de hibridomas (Figura 9)

Foram criados ratinhos transgênicos que continham um locus de anticorpo apenas de cadeia pesada que consistia em dois domínios VHH de lama, regiões D e J humanas e regiões constantes de IgG2 e 3 (sem um domínio CH1).

Os ratinhos com 8 semanas de idade foram imunizados tanto com a proteína de choque térmico de *E. coli* 70 (hsp70). Foi injetado 20 µg ou 5 µg de antigénio com adjuvante Specol (IDDL0, Lelystadt, Países Baixos) respetivamente sc nos dias 0, 14, 28, 42 e ip no dia 50. Foi colhido sangue no dia 0, 14 e 45. Depois de três reforços foi detetado um título baixo de anticorpos específicos para o antigénio em 1 de 3 ratinhos HLL-MD1 imunizados com Hsp70 (Figura 9).

Foi realizada uma fusão padrão de células de baço com uma linha de células de mieloma para gerar um anticorpo monoclonal, o que resulta numa linha de células de hibridoma monoclonal contra a proteína hsp70. O HCAb anti-HSP-70 consiste no segmento VHH de lama mais próximo da região D (VHH 2) recombinado com o segmento IgHD3-10 humano (número de acesso X13972) e o segmento IgHJ4-02 humano (número de acesso X86355). Apesar de não ser em alta frequência, as VHHs têm algumas mutações que dão origem às alterações de aminoácidos observadas na Figura 4A, quando comparadas com a configuração da linha germinal. A análise por RT-PCR mostrou também apenas uma transcrição de IgH produtiva no hibridoma, o que sugere que não há outras transcrições feitas. O anticorpo de IgG2 α HSP70 é segregado como um dímero apenas de cadeia pesada (transferências de Western sob condições de gel desnaturante (dímero) e gel não desnaturante (de monómeros) Figura 9). As células do baço foram fundidas com células de mieloma Sp2-O-Agl4 (oferta de R. Haperen) no dia 56, utilizando um kit ClonalCell™-HY (StemCell Technologies, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante.

Ratinhos transgênicos que continham um locus de anticorpo apenas de cadeia pesada que consistia em dois domínios VHH de lama, regiões D e J humanas, uma IgM humana e regiões constantes de IgG2 e 3 (todas sem um domínio CH1, Figura 7) foram imunizados com TNF α para obter anticorpos HC-IgM. Um em cada três ratos mostrou soros positivos em análises ELISA padrão. Uma fusão de mieloma

padrão originou um hibridoma de IgM positivo (Figura 11). Após filtração em gel em Sepharose 6B em condições não-reduzidas cada fração da coluna foi carregada num gel sob condições redutoras e detetada por IgM-HRP α humana (Figura 15). O fracionamento em condições não redutoras mostrou que a HC-IgM é segregada como um anticorpo multimérico com o mesmo tamanho que uma IgM humana de controlo (após subtração do peso molecular das cadeias leves e do domínio CH1 que estão ausentes da HC-IgM). O fracionamento em gel de cada fração da coluna sob condições redutoras mostrou o monómero esperado (Figura 15).

ELISA da Ig Sérica

Sangue de ratinhos com 15-25 semanas de idade foi colhido em tubos revestidos com EDTA, centrifugado durante 15' à temperatura ambiente (TA) e o sobrenadante diluído a 1:5 em PBS. Uma placa de 96 poços foi revestida durante 2 horas com 5 mg/mL de uma IgG de cabra anti-humana (YES Biotechnology) ou uma IgM de cabra anti-humana (Sigma), lavada com PBS, bloqueada durante 1 hora à TA com solução de bloqueio (1,5% de BSA/1,5 % de leite em pó/0,1% de Tween 20/PBS) e lavada três vezes com PBS. Diluições sucessivas de amostras de soro e padrões (IgG2 humana ou IgM humana (Sigma, Zwijndrecht, Países Baixos)) foram carregados e incubados durante 2-4 horas e as placas foram lavadas 6 vezes com PBS antes da adição de um anticorpo secundário (IgG de cabra anti-humana ou IgM de cabra anti-humana acoplada com HRP (Sigma, Zwijndrecht, Países Baixos)

diluída a 1:2000). Todas as diluições foram realizadas numa solução de bloqueio. Após 1-2 h de incubação à TA e lavagem em PBS, foi adicionado o substrato POD (Roche).

O ELISA para a deteção de sdAbs solúveis específicos para o antigénio a partir da biblioteca de fagos de IgG2 é mostrado na Figura 11. Os sdAbs solúveis foram usados como anticorpos primários nas placas revestidas com antigénio, seguido de anticorpo de ratinho contra α -myc e anticorpo de cabra contra α -rato conjugado com HRP. Foi utilizado POD como um substrato. O painel inferior mostra as impressões digitais de clones com a enzima de restrição Hinf I, que mostra 5 inserções diferentes que codificam o sdAb contra *B.Pertusis*.

Construção da biblioteca de anticorpos e triagem

Isolou-se o ARN total dos baços de ratinhos apenas com uma cópia única de IgG imunizados com DKTP (Figura 7 após tratamento com cre) utilizando o sistema de isolamento de ARN Ultraspec (Biotecx Laboratories Inc., Houston, Texas, EUA). O ADNc foi feito utilizando oligo dT. Os fragmentos de ADN que codificam fragmentos VHHDJ foram amplificados por PCR utilizando iniciadores específicos: iniciador Sfil inverso de vh1 (Dekker et al. 2003), em combinação com iniciador hIgG2hingrev (5'-AATCTGGGCAGCGGCCGCTCGACACAACATTTGCGCTC-3'). Os VHHDJs amplificados (~ 400 pb) foram digeridos com Sfi I/Not I, purificados em gel e clonados no vetor fagemídico pHEN-1

digerido com Sfil/NotI.

A transformação em células eletrocompetentes TG1 resultou numa biblioteca de anticorpos de domínio único humanos. Foram realizadas duas rondas de seleção utilizando pesquisa sobre antigénios vacinais adsorvidos sobre plástico (imunotubos revestidos com vacina não diluída). A análise de restrição e sequenciamento foram padrão.

RT-PCR de lócus apenas de cadeia pesada

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

Embora, a análise de RT-PCR em placas de Peyer mostre que são usadas ambas as V_H , todos os anticorpos sequenciados rearranjaram a $VH2$. A fonte de variabilidade do repertório é a região CDR3 formada pela seleção de segmentos D e J e pelas junções V-D e D-J. A utilização de segmentos J humanos é semelhante à observada em rearranjos

humanos, sendo os segmentos JH4 e JH6 os mais frequentemente usados.

Esta análise mostrou que ambas as VHs, os diferentes segmentos D humanos e todos os segmentos J humanos são utilizados para contribuir para um repertório de anticorpos diversificado. Também mostrou a presença de células B com IgG3 trocada e a ocorrência de mutações somáticas por comparação de cada gene rearranjado com o seu homólogo da linha germinal, ou seja, a V_H original na construção transgênica (ver Figura 12). Portanto, o recetor do antígeno de IgG apenas de cadeia pesada humana pode fornecer os sinais necessários para a maturação de células B.

Imunocoloração

A Figura 13 mostra os resultados de imunocoloração de uma linha de células Tet adicionalmente transfetada com o plasmídeo de resposta que continha o anticorpo A5 (Dekker et al. 2003). O painel superior mostra a produção de anticorpos A5 induzida por doxiciclina (vermelho) no citoplasma e a coloração nuclear de células com DAPI (azul). O painel inferior mostra que as células que expressam rtTA no núcleo são aquelas que produzem o A5 após indução (painel superior). A coloração foi feita com um dos HCAb humanos contra rtTA (verde) com a sequência mostrada abaixo. A IgG de cabra anti-humana conjugada com FITC foi utilizada como um passo secundário. O A5 foi

detetado como descrito anteriormente por Dekker et al. 2003. O anticorpo contra rTTA foi uma IgG3 com a seguinte sequência:

241 AGACTCT

80 R L

301 CCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTC

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

361 CAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGCTATTACTAGTGGTGGTAGCACAAGGTATGCAG

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

421 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGC

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

481 AAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTTGATCTCTATGGTTC

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

541 GGGGAGCCCGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGAGCTCA

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

601 AAACCCCACTT

200 K T P L

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

Análises de transferência de Western

A Figura 14 mostra a transferência de Western dos soros de diferentes linhas de ratinhos transgênicos que contêm o locus IgM mais IgG (Figura 5) após tratamento com cre (isto é, IgM suprimida, apenas deixada a IgG). Os soros foram purificados por prot G e fracionados em gel sob

condições redutoras (Figura 14, painel da direita) e não redutoras (Figura 14, painel da esquerda). Os controles foram ratinhos KO de base e uma amostra de soro humano normal. Note-se a diferença de tamanho entre os dois geles, o que mostra que a IgG apenas de cadeia pesada humana é um dímero.

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

Fracionamento do tamanho da IgM humana produzida pelos ratinhos de lócus de IgM mais IgG

O soro dos ratinhos de IgM mais IgG (Figura 8) foi fracionado por filtração em gel sob condições não redutoras, após mistura com uma amostra de soro humano como um controle. Os resultados são mostrados na Figura 15. Os pesos moleculares dos complexos na coluna diminuía de pista para pista (que representam cada fração) da esquerda para a direita. As frações (cada pista) foram analisadas por eletroforese em gel sob condições redutoras.

Foi realizada análise de ELISA sobre um número de hibridomas feitos a partir de ratinhos que continham o lócus de IgM mais IgG (Figura 8) imunizados com TNF α humano. Os resultados são mostrados na Figura 16. As duas linhas superiores na Figura 16 foram analisadas com uma IgG anti-humana, as duas linhas seguintes com uma IgM anti-humana. As amostras de soro (setas) mostram que o rato

gerou anticorpos anti-TNF α tanto de IgG como de IgM. A seta simples mostra um hibridoma positivo para IgM. Os poços foram revestidos com TNF α humano disponível comercialmente. Todos os procedimentos foram padrão.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM

<110> CRAIG, Roger Kingdon

<120> MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO

<130> PO55642EP

<150> GB0416392.9

<151> 2004-07-22

<150> GB0511881.5

<151> 2005-06-10

<150> EP05766644.8

<151> 2005-07-22

<160> 35

<170> SeqWin99, versão 1.02

<210> 1

<211> 39

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 1

aatctgggca gcggccgcct cgacacaaca tttgcgctc 39

<210> 2

<211> 106

<212> ADN

<213> HCAb Humano (IgG3) contra rtTA

<400> 2

```
agactctcct gtgcagcctc tggaagcctc ttcagtatca atgccatggg ctgggtacgc 60
caggctccag ggaagcagcg cgagttgggc ccagctatta ctagtgggtg tagcacaagg 120
tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgccaa gaacacgggtg 180
tatctgcaaa tgaacagcct gaaacctgag gacacggcgg tctattactg tttgatctct 240
atggttcggg gagcccgttt tgactactgg egccaggga ccttggtcac cgtctctca 300
gagctcaaaa cccaactt 318
```

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> HCAb Humano (IgG3) contra rtTA

<400> 3

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1 5 10 15
 Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
 20 25 30
 Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 50 55 60
 Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Ile Ser
 65 70 75 80
 Met Val Arg Gly Ala Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 85 90 95
 Thr Val Ser Ser Glu Leu Lys Thr Pro Leu
 100 105

<210> 4

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 4

ctggaattct caaccatgga gctggggctg agc 33

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 5

gacaagcttt acccgagac agggagaggc 30

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 6

gacaagcttt acccgagac agggagaggc 30

<210> 7

<211> 34

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 7

gtcctcgagg cccaggtcca actgcaggag tctg 34

<210> 8

<211> 37

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 8

gtcgaattct cattccgagg agacggtgac ctggggtc 37

<210> 9

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência Charneira de IgG

<400> 9

gagcgcgaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgccca 36

<210> 10

<211> 44

<212> ADN

<213> Sequência charneira de IgG de substituição

<400> 10

agcttctgag cgcaaaccac cagtcgagcc accaccgcca ccac 44

<210> 11

<211> 44

<212> ADN

<213> Complemento da sequência charneira de IgG de substituição

<400> 11

tcgagtgggtg gcggtgggtgg ctcgactggg ggtttgcgct caga 44

<210> 12

<211> 404

<212> ADN

<213> VDJg*1

<400> 12

```

gacacggccg ttagtatct gtaaggcaga tggggtagta ctatggttcg gggagtccac 60
cactgcgggt agaggggcca gggaacactg gtcgcgggtg catcagcctc caccaagggc 120
ccatcggtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 180
ggctgccttg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 240
ctgaccagcg ggtgacacac cttcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 300
agcagcggtg tgaccgtgcc ctccagcaac ttccggcacc agacctacac ctgcaacgta 360
gatcacaagc ccagcaaacac caagagcgca aatgttgtgt cgag 404

```

<210> 13

<211> 352

<212> ADN

<213> VDJg*2

<400> 13

```

gacattccca cttcgatctc tggggccctg qcaccctqgt cactgtctcc tcaqccctca 60
ccaagggcc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag 120
cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccgaacc ggtgaagggtg tccgtggaact 180
cagggcctcc gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtc tccaggactct 240
actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcaactt cggcaccacag acccagacct 300
gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca agagcgcaaa tgttgtgtcg ag 352

```

<210> 14

<211> 394

<212> ADN

<213> VDJg*3

<400> 14

```

gacacggcgg tctattactg taa-gccaact acgatatttt gactggttat tatagacgt 60
actgggggcca gggaaacctg gtcacctgt ctcagacctc cgccaagggc ccacgggtot 120
tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggtgacctgg 180
tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgc tgtcgtgga ctcaggcgt ctgaccagcg 240
gcctgcacac cttcccagct gtctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg 300
tgaccgtgcc ctccagcaac ttccggcacc agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc 360
ccagcaacac caagagcgca aatgttgtgt cgag 394

```

<210> 15

<211> 380

<212> ADN

<213> VDJg*4

<400> 15

```

gacacggcgg tccaatcgga tacagctatg gttacgtact ttgactactg gggccaggga 60
acctgggtca cgtctctctc agcctccacc aaggggccat cgtctctcc cctggcgcc 120
tgctccagga gcaacctcga gagcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 180
cccgaaacgg tgacgctgtc gtggaactca ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc 240
ccagctgtcc tacagtcttc aggactctac tccctcagca gcctgggtgac cgtgccctcc 300
agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagcccag caacaccaag 360
agcgcaaatg ttgtgtcgag 380

```

<210> 16

<211> 417

<212> ADN

<213> VDJg*5

<400> 16

```

gacacggcgg tctattactg taa-gcagat gtattactat ggttcgggga gcctatagcc 60
ttactactac taoggtatgg acgcttgggg ccaagggacc acggtaccg tctcctcagc 120
ctccaccaag ggcccatcgg tctccccct ggcgcctgc tccaggagca cctccgagag 180
cacagcggcc ctgggtgtgc tggcacaagg ctacttccc gaacgggtga cgtgtgtgtg 240
gaactcaggc gctctgacca gggcgtgca caccttcca gctgtctac agtccctagg 300
actctactcc ctcagcagcg tggtagcgt gccctccagc aacttcggca ccagaccta 360
cacctgcaac gtgatcaca agcccagca cccaagagc gcaaatgttg tgtcgag 417

```


<210> 17

<211> 108

<212> PRT

<213> alfa-B.pertussis 1

<400> 17

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
1             5             10             15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
                20             25             30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
        35             40             45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
        50             55             60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Lys
65             70             75             80
Gly Pro Ile Thr His Val Arg Gly Val His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                85             90             95
Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
        100             105

```

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> alfa-B.pertussis 2

<400> 18

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
1             5             10             15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
        20             25             30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
        35             40             45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
        50             55             60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Lys
65             70             75             80
Thr Pro Ile Thr His Ile Arg Gly Val His His Trp Gly Gln Gly Thr
        85             90             95

```

Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
 100 105

<210> 19

<211> 108

<212> PRT

<213> alfa-B.pertussis 3

<400> 19

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1 5 10 15

Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
 20 25 30

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 50 55 60

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Arg
 65 70 75 80

Thr Pro Ile Thr Val Val Arg Gly Val His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 85 90 95

Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
 100 105

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> alfa-B.pertussis 4

<400> 20

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
1          5          10          15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
          20          25          30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
          35          40          45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
          50          55          60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Arg Thr
65          70          75          80
Gly Pro Ile Thr His Val Arg Gly Val Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
          85          90          95
Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
          100          105

```

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> alfa-B.pertussis 5

<400> 21

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
1          5          10          15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
          20          25          30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn His Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
          35          40          45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
          50          55          60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu
65          70          75          80
Ser Pro Ile Thr Lys Val Arg Gly Val Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          85          90          95
Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
          100          105

```

<210> 22

<211> 59

<212> PRT

<213> neVHH1 original

<400> 22

```
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile
1          5          10          15
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Glu Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys
          20          25          30
Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
          35          40          45
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
      50          55
```

<210> 23

<211> 59

<212> PRT

<213> neVHH1 clone 1

<400> 23

```
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile
1          5          10          15
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Glu Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys
          20          25          30
Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
          35          40          45
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
      50          55
```

<210> 24

<211> 59

<212> PRT

<213> neVHH1 clone 2

<400> 24

```

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

```

<210> 25

<211> 59

<212> PRT

<213> neVHH1 clone 3

<400> 25

```

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

```

<210> 26

<211> 58

<212> PRT

<213> neVHH2 original

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 58

<212> PRT

<213> neVHH2 clone 1

<400> 27

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
1           5           10           15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Gln Leu Val Ala Ala
20           25           30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
35           40           45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
50           55

```

<210> 28

<211> 58

<212> PRT

<213> neVHH2 clone 2

<400> 28

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Val Met
1           5           10           15
Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Gln Leu Val Ala Gly
20           25           30
Val Thr Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
35           40           45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
50           55

```

<210> 29

<211> 58

<212> PRT

<213> neVHH2 clone 3

<400> 29

```
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1              5              10              15

Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Pro
      20              25              30

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
      35              40              45

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
      50              55
```

<210> 30

<211> 78

<212> PRT

<213> VHH2 linha germinal

<400> 30

```
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1              5              10              15

Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
      20              25              30

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
      35              40              45

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
      50              55              60

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
      65              70              75
```

<210> 31

<211> 105

<212> PRT

<213> alfa-Tetanus 1

<400> 31

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
1          5          10          15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
20          25          30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
35          40          45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
50          55          60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu
65          70          75          80
Arg Ala Gly Asp Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
85          90          95
Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
100          105

```

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> alfa-Tetanus 2

<400> 32

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
1          5          10          15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
20          25          30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
35          40          45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
50          55          60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Val Leu
65          70          75          80
Trp Phe Gly Glu Leu Ser Asp Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
85          90          95
Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
100          105

```

<210> 33

<211> 108

PE2311874

- 70 -

<212> PRT

<213> alfa-Tetanus 3

<400> 33

```
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
      5              10              15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
      20              25              30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
      35              40              45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
      50              55              60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Asp
      65              70              75              80
Cys Trp Gly Ser Arg Trp Tyr Phe Asp His Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
      85              90              95
Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
      100              105
```

<210> 34

<211> 111

<212> PRT

<213> alfa-Tetanus 4

<400> 34

```
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
      1              5              10              15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
      20              25              30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
      35              40              45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
      50              55              60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Asp
      65              70              75              80
Thr Ser Pro Pro Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
      85              90              95
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
      100              105              110
```

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213> alfa-hsp70

<400> 35

```

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met
 1              5              10              15
Gly Trp Ser Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
          20              25              30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35              40              45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val His Leu Gln Met
 50              55              60
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Gly
 65              70              75              80
Asn Thr Met Val Arg Gly Val Ile Ile Lys Tyr Arg Phe Asp Tyr Trp
          85              90              95
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
          100              105              110

```

Lisboa, 18 de julho de 2017

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um anticorpo apenas de cadeia pesada V_H que compreende:

(a) a imunização de um rato transgênico que expressa um locus heterólogo de cadeia pesada V_H , em que:

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

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

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

(iv) o locus de cadeia pesada V_H recombinado, quando expresso, é capaz de formar um anticorpo apenas de cadeia pesada solúvel que compreende um domínio de ligação V_H específico para o antígeno, solúvel e uma região efetora constante desprovida de um domínio C_{H1} ;

(b) o isolamento de uma sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo apenas de cadeia pesada V_H a partir de células produtoras de anticorpo; e

(c) a produção do anticorpo apenas de cadeia pesada V_H utilizando técnicas de ADN recombinante.

2. Método da reivindicação 1, compreende ainda a clonagem de um locus V_H que codifica o domínio de ligação V_H do anticorpo apenas de cadeia pesada V_H e a expressão do domínio de ligação V_H num sistema de expressão bacteriano, de levedura, mamífero ou alternativo.

3. Método da reivindicação 1 ou da reivindicação 2, em que o referido rato transgénico foi manipulado para ter uma capacidade reduzida para produzir anticorpos que incluam cadeias leves.

4. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que os loci da cadeia pesada de imunoglobulina endógenos ao rato são suprimidos ou silenciados.

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

Lisboa, 18 de agosto de 2017

FIG. 1

Geração de IgG apenas de cadeia pesada

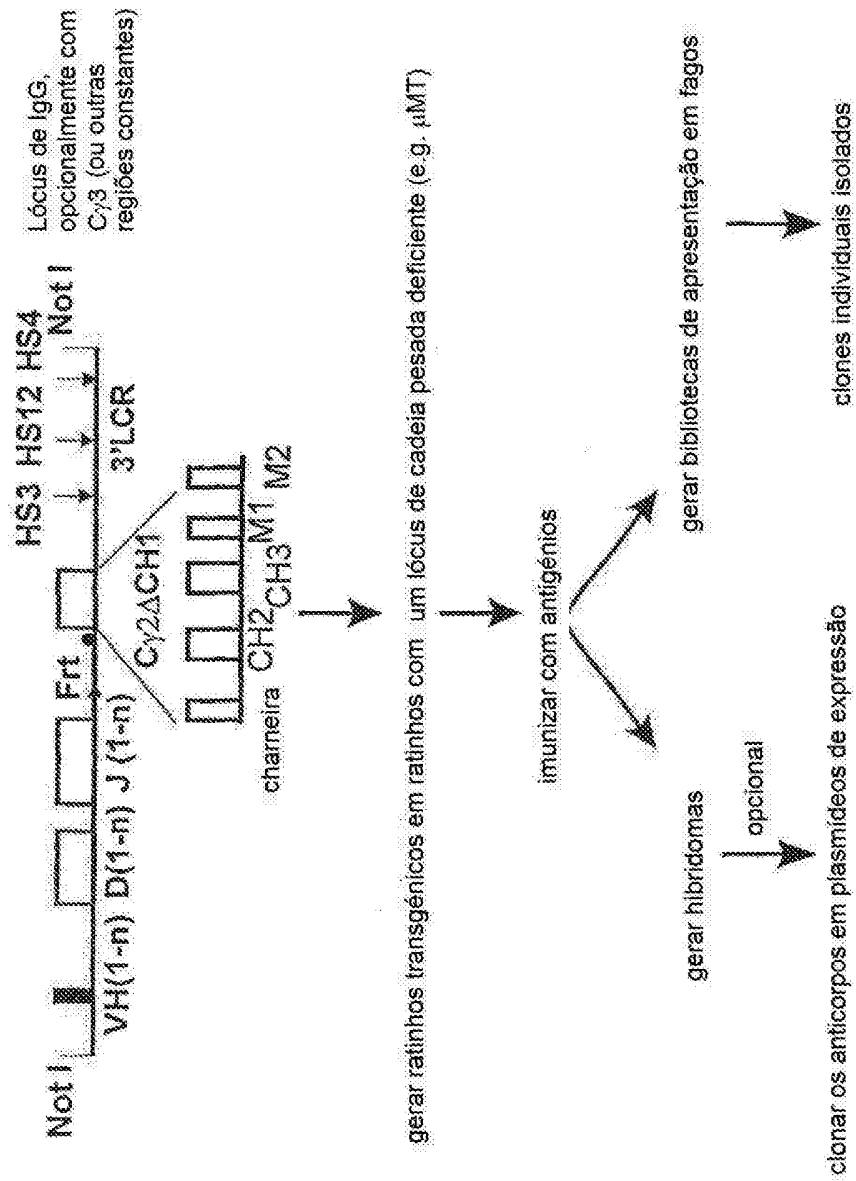


FIG. 2

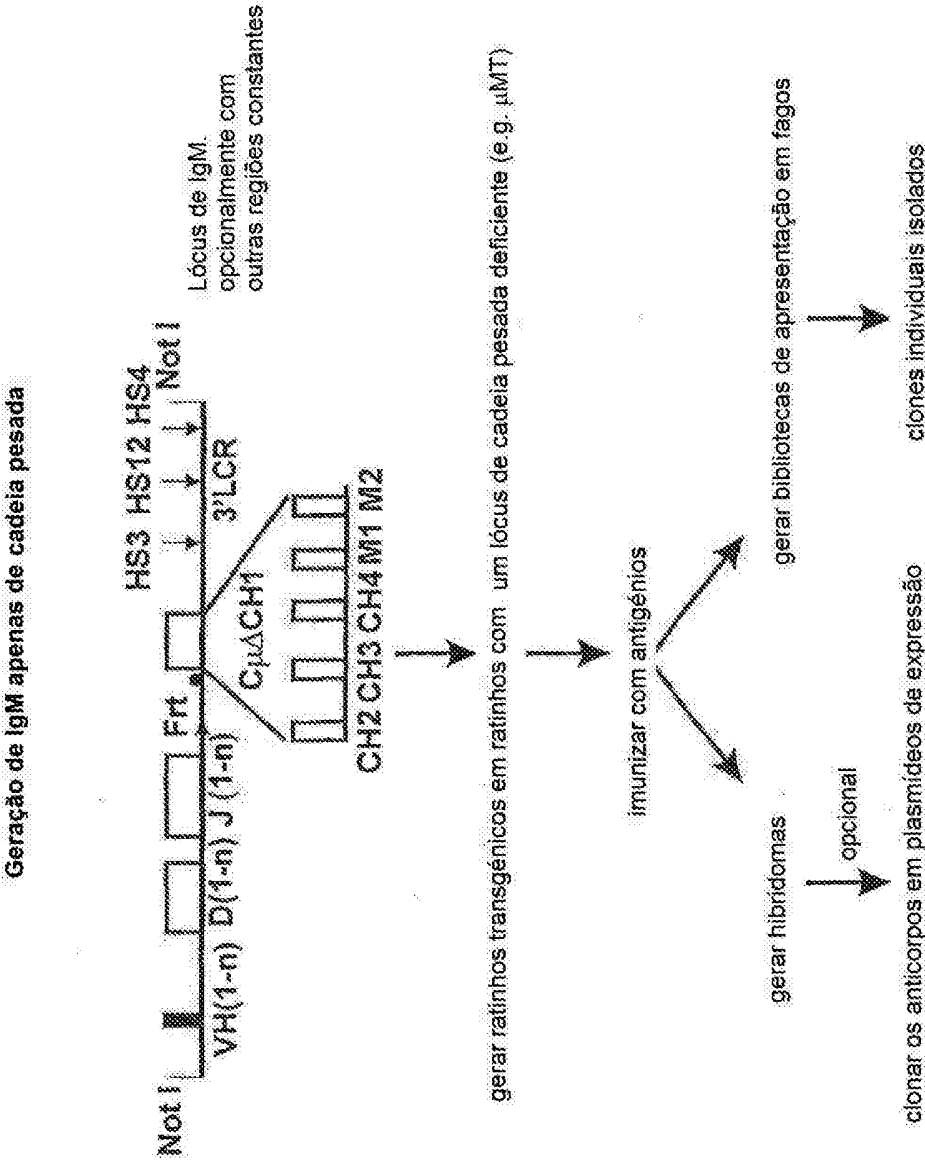


FIG. 3

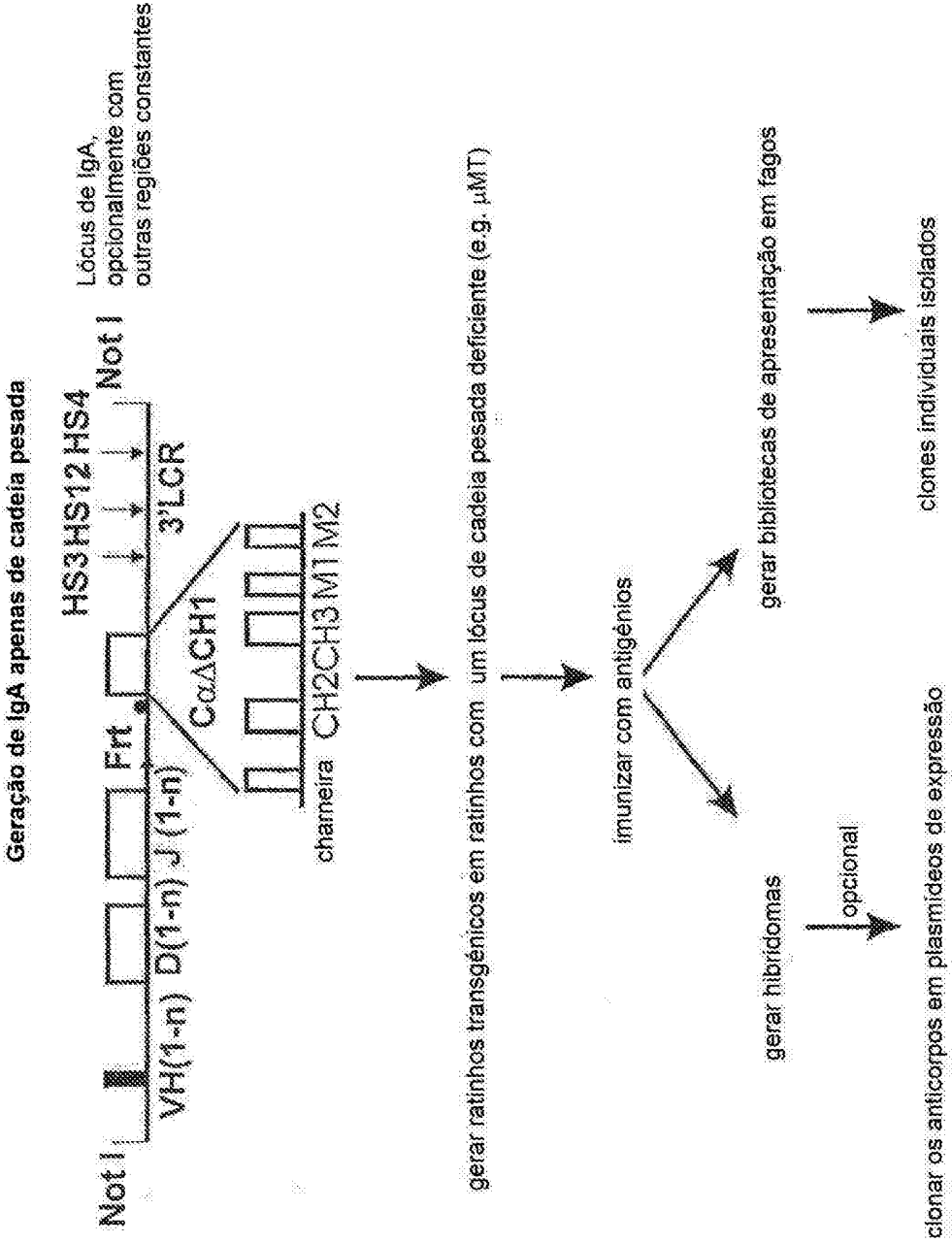


FIG. 4

	vrH	D	J
VDJg*1	GACACGGCCGTGTAGTATCTGTAAAGCAGATGG.....		GGTAGTACTATGCTTCB...GGGA.
VDJg*2	GAC.....		ATGCCAGCTTCGATC...T....
VDJg*3	GACACGGCCGTCTATTACTGTAAATGCCTACTAG.....		ATATTTGACTGCTTAT...TATA.
VDJg*4	GACACGGCCGTCCAAATCGGATACAG.....		CTATGGTTACGTACTTT
VDJg*5	GACACGGCCGTCTATTACTGTAAATGCAGATGTATTACTATGCTTCGGGAGCCTATAGCCTTACTACTACCGTATG.		
		J	CH1
VDJg*1		GTCCACCACTGCGGCTAGAGGGCCAGGGAACCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
VDJg*2	CTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
VDJg*3	GAC.....	GCTACTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
VDJg*4	GACTA.....	CTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
VDJg*5	GACGT.....	CTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
		CH1	
VDJg*1		CCTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
VDJg*2		CCTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
VDJg*3		CCTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
VDJg*4		CCTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
VDJg*5		CCTGGGCGGTGGACCCCTGGTCCTGGTGTATCAGCCTCCCAAGGGCCCTCGGTCTTCCC	
		CH1	
VDJg*1		TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACAGCGGGCTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC	
VDJg*2		TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACAGCGGGCTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC	
VDJg*3		TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACAGCGGGCTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC	
VDJg*4		TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACAGCGGGCTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC	
VDJg*5		TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACAGCGGGCTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC	
		CH1	
VDJg*1		TCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTGCGCTCCAGCAACTTCGGCACCTACACCTGCAACCTAGATTCACAAGCCAG	
VDJg*2		TCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTGCGCTCCAGCAACTTCGGCACCTACACCTGCAACCTAGATTCACAAGCCAG	
VDJg*3		TCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTGCGCTCCAGCAACTTCGGCACCTACACCTGCAACCTAGATTCACAAGCCAG	
VDJg*4		TCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTGCGCTCCAGCAACTTCGGCACCTACACCTGCAACCTAGATTCACAAGCCAG	
VDJg*5		TCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTGCGCTCCAGCAACTTCGGCACCTACACCTGCAACCTAGATTCACAAGCCAG	
		CH1	
VDJg*1		CAACACCAAGAGCGCAATGTTGTGTCCAG	
VDJg*2		CAACACCAAGAGCGCAATGTTGTGTCCAG	
VDJg*3		CAACACCAAGAGCGCAATGTTGTGTCCAG	
VDJg*4		CAACACCAAGAGCGCAATGTTGTGTCCAG	
VDJg*5		CAACACCAAGAGCGCAATGTTGTGTCCAG	

◆ GGTGGACAAGACAGTT

FIG. 5

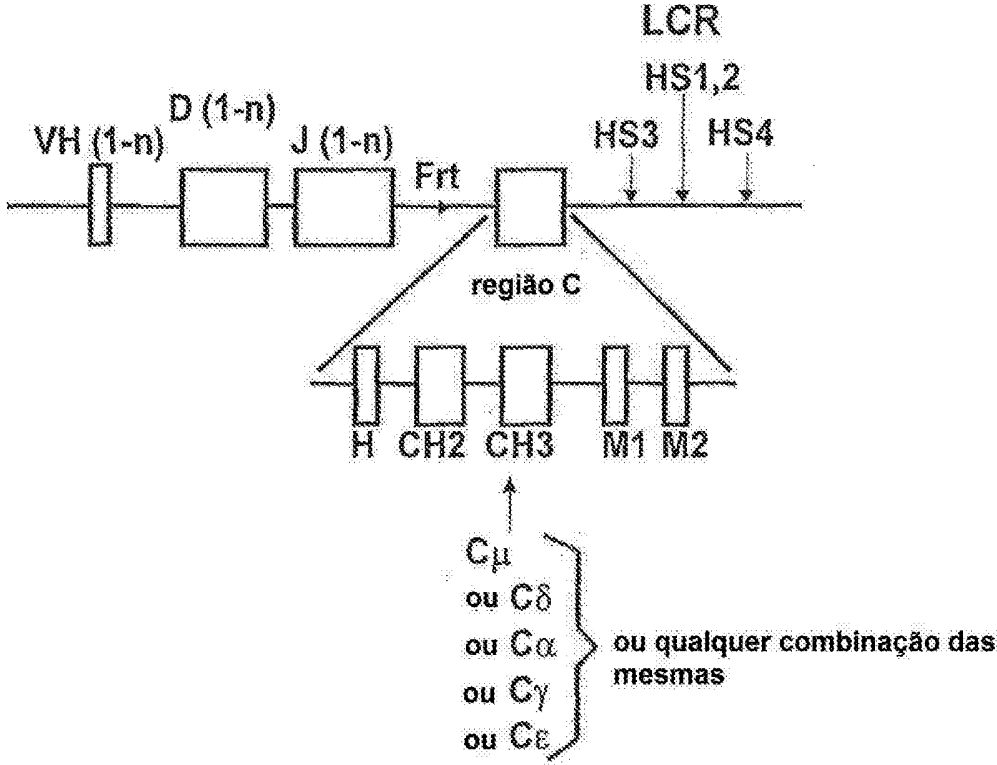


FIG. 6

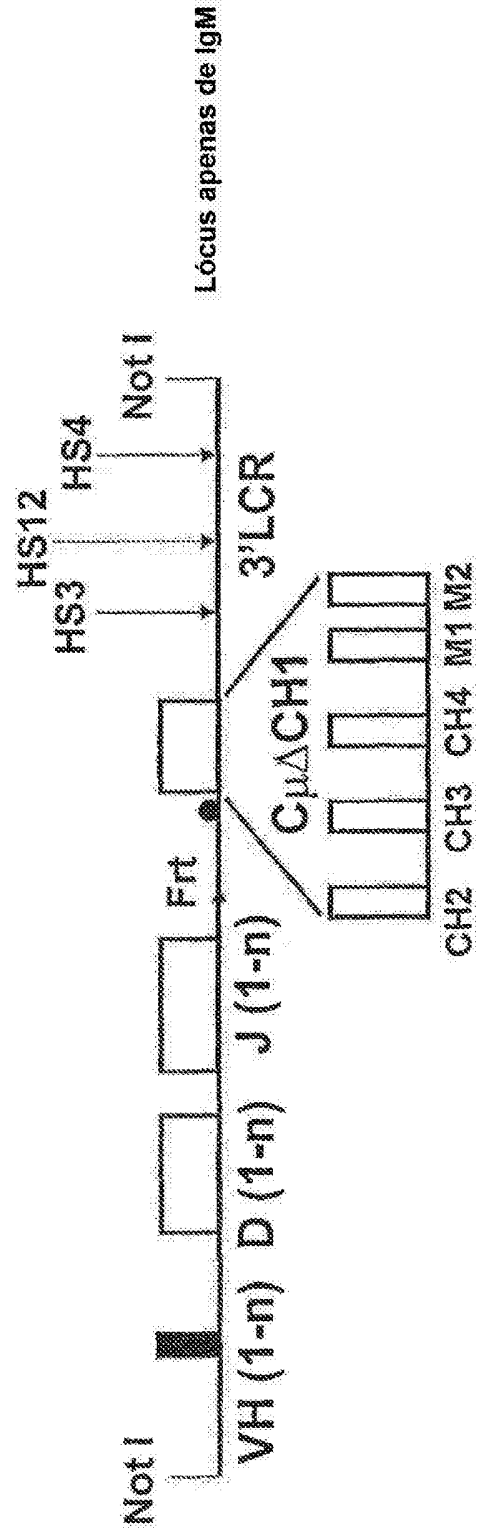


FIG. 8

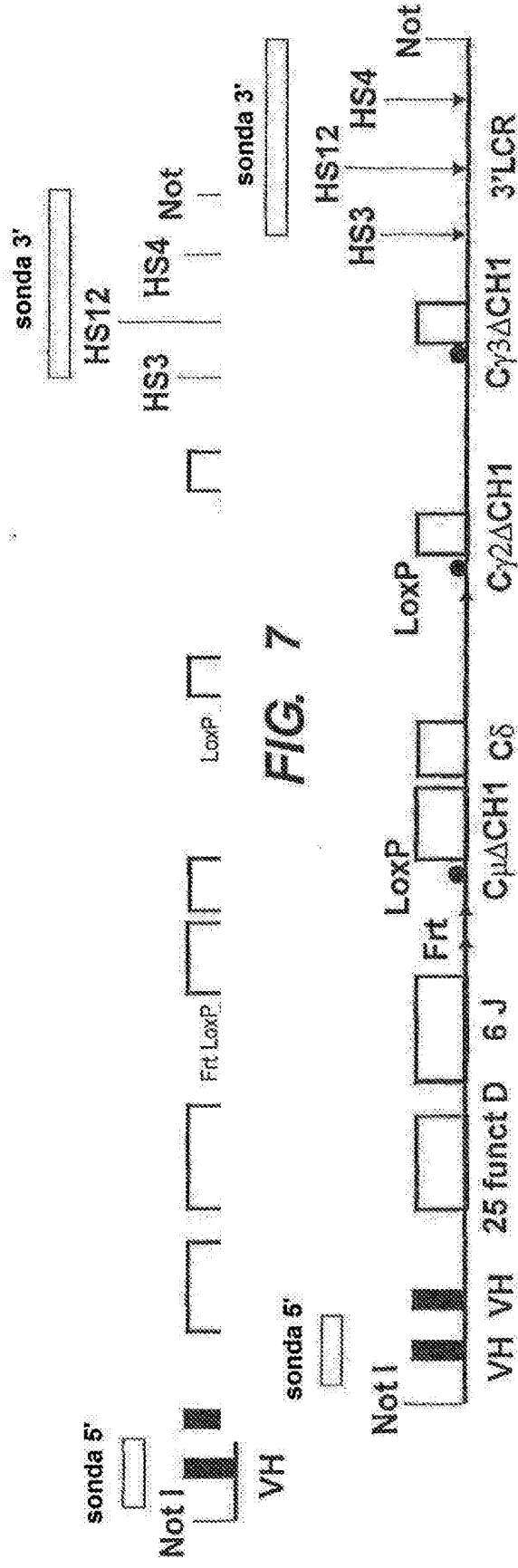
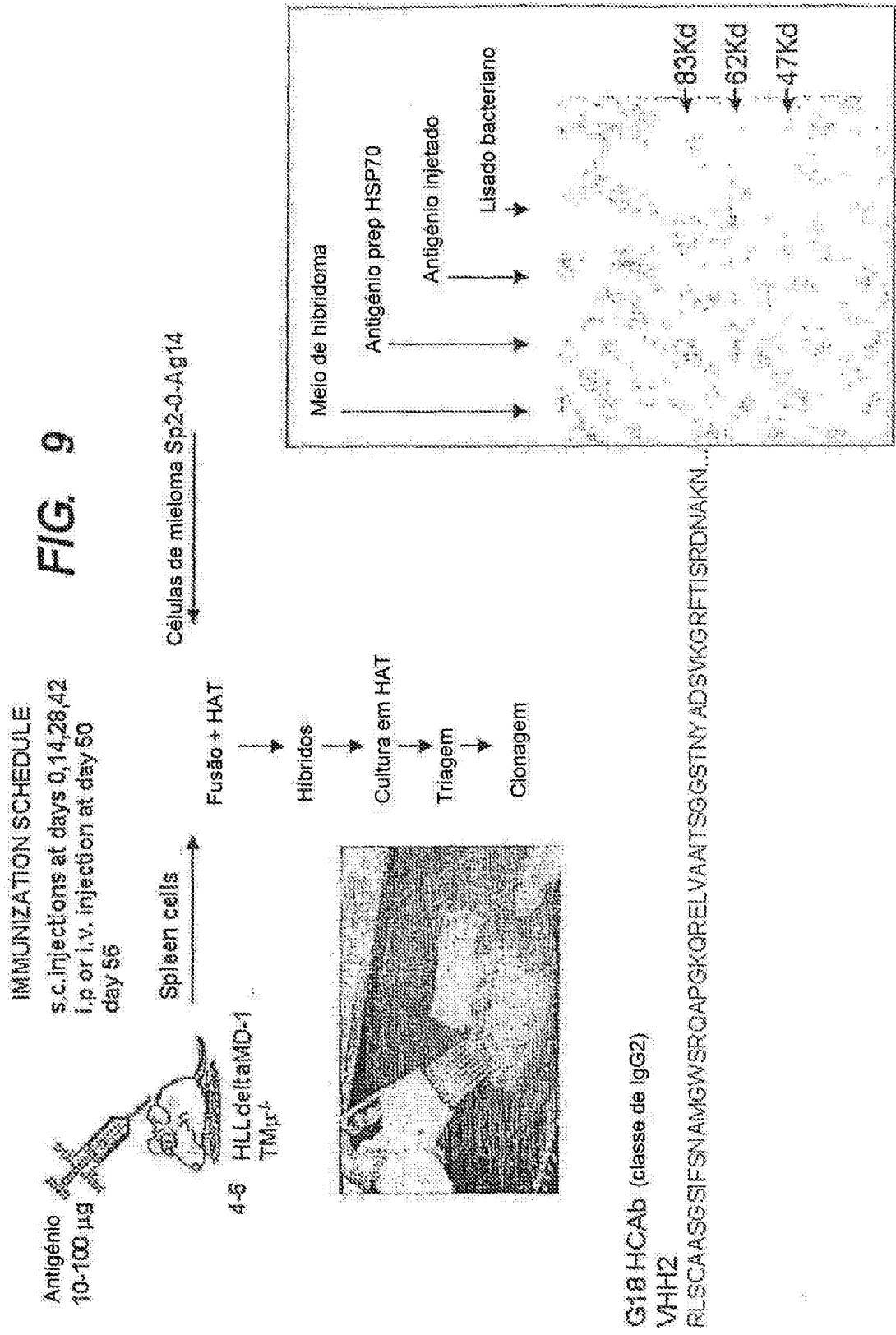
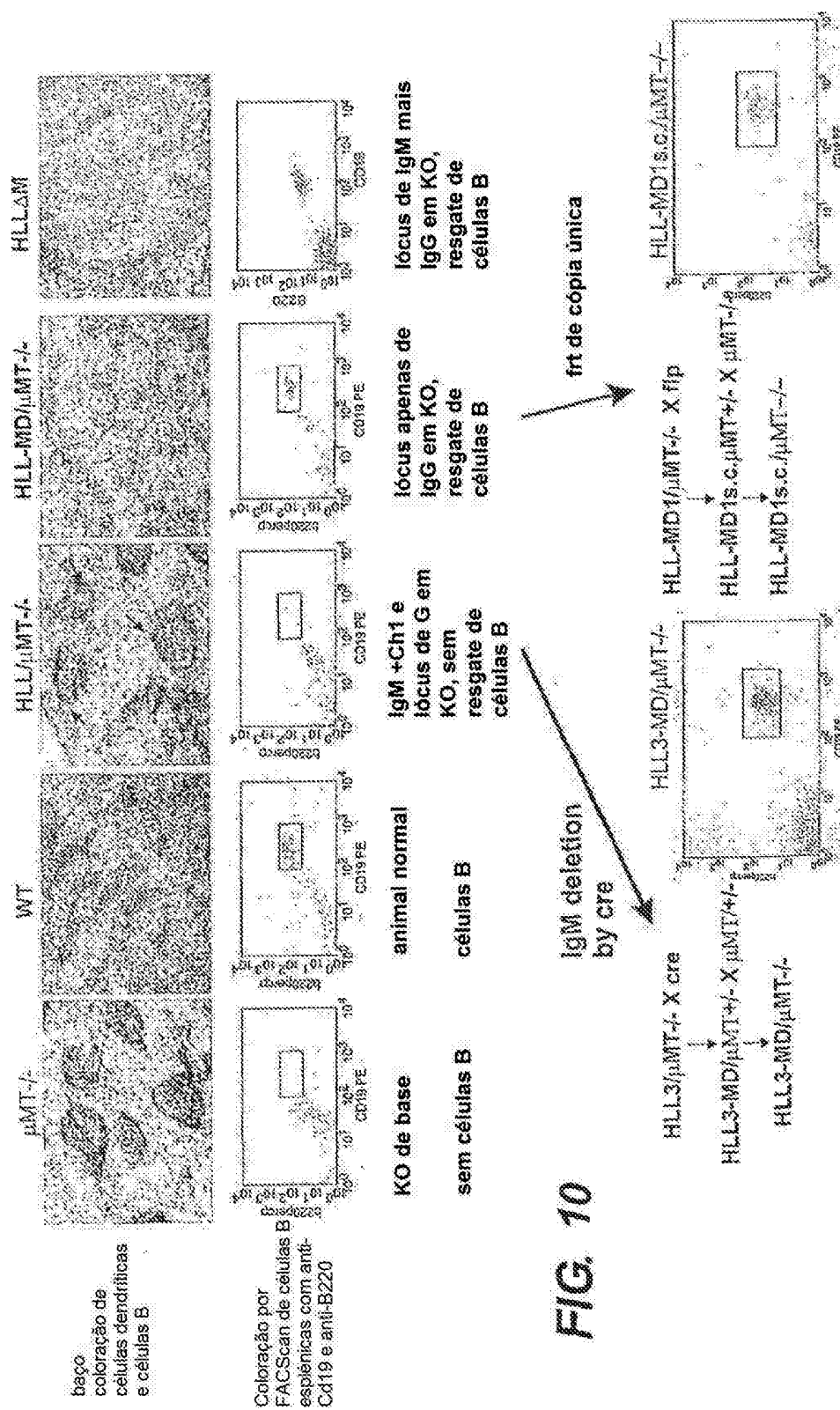
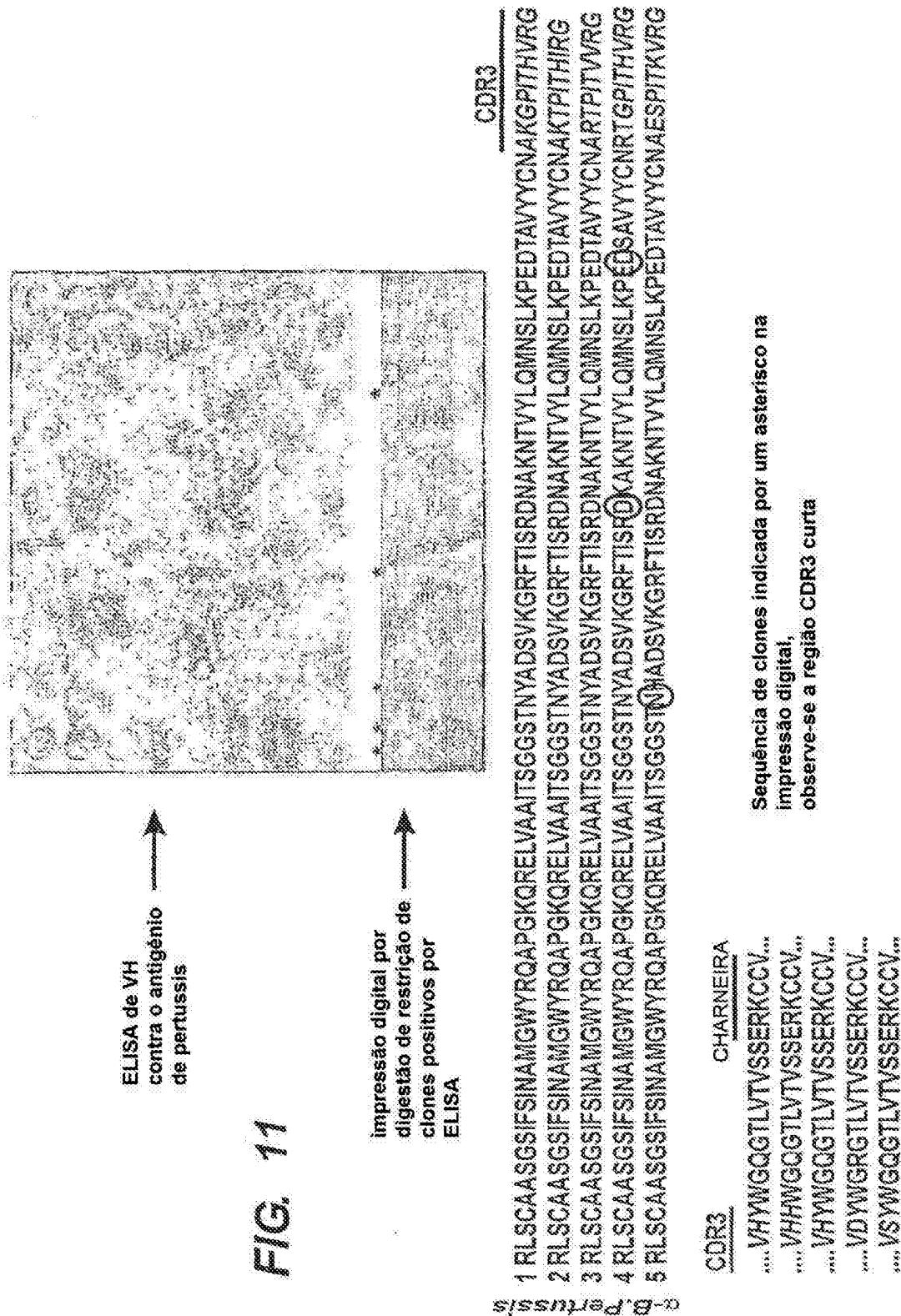


FIG. 7

Locus de IgM mais IgG, C δ é opcional







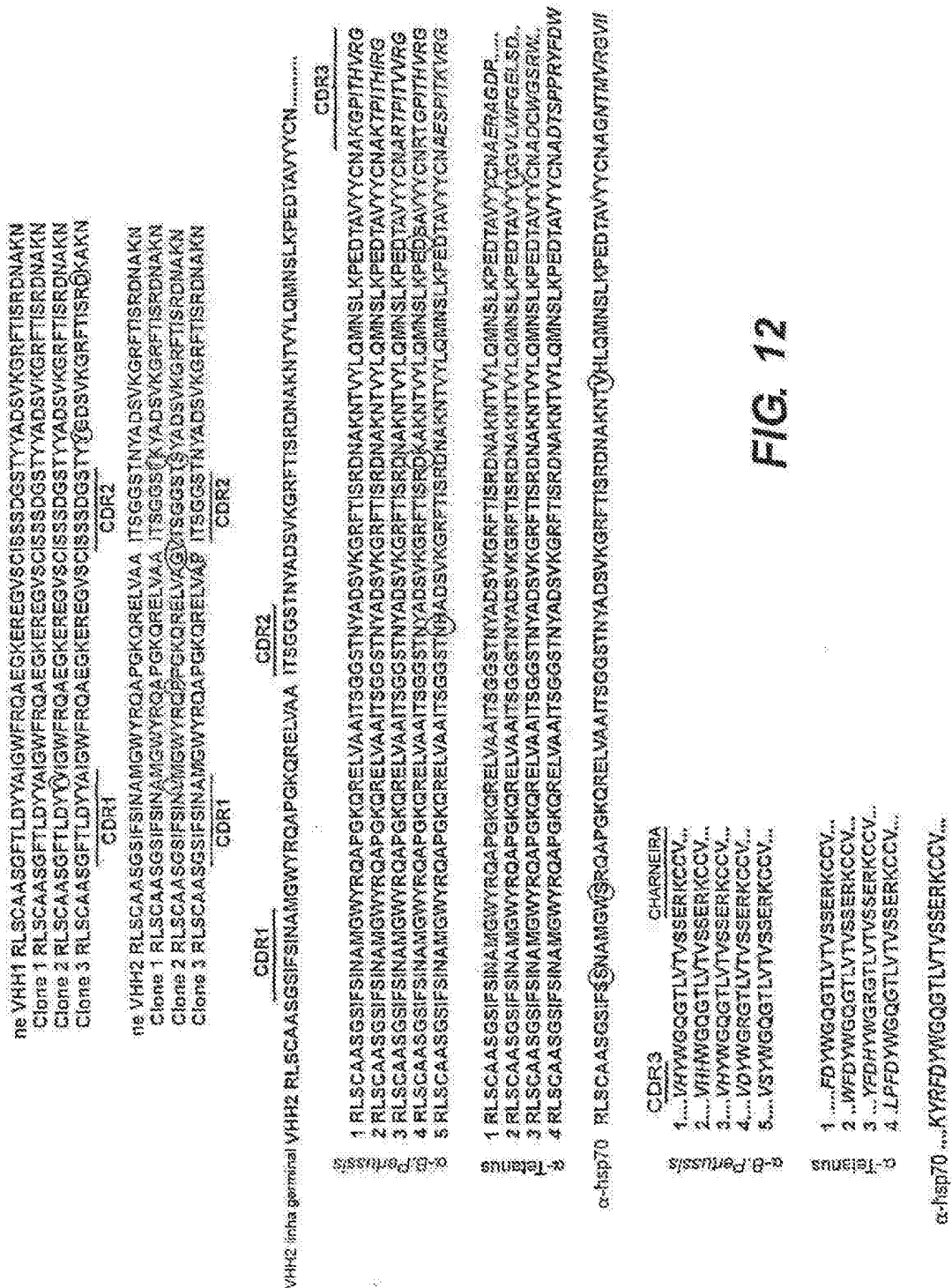
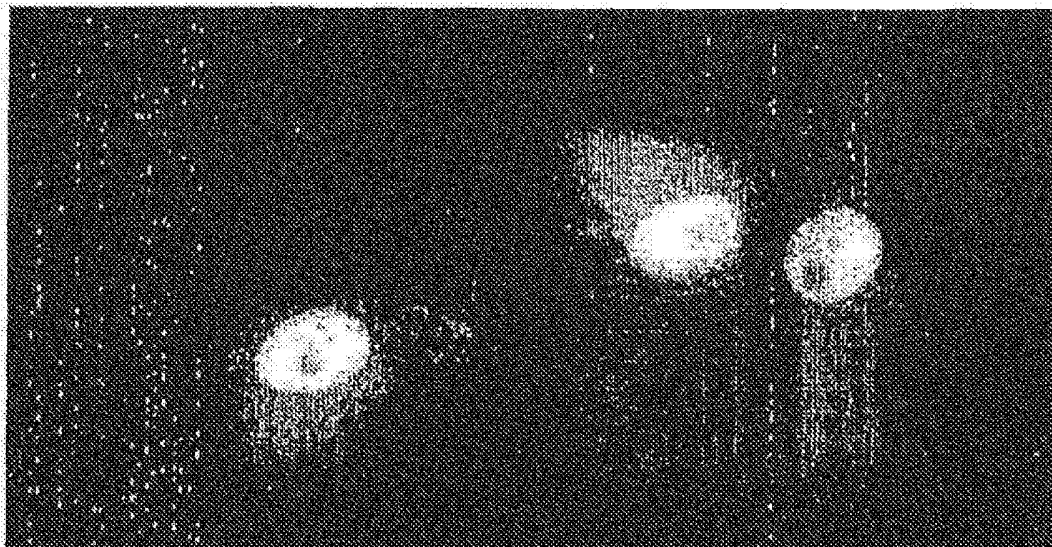


FIG. 12

FIG. 13



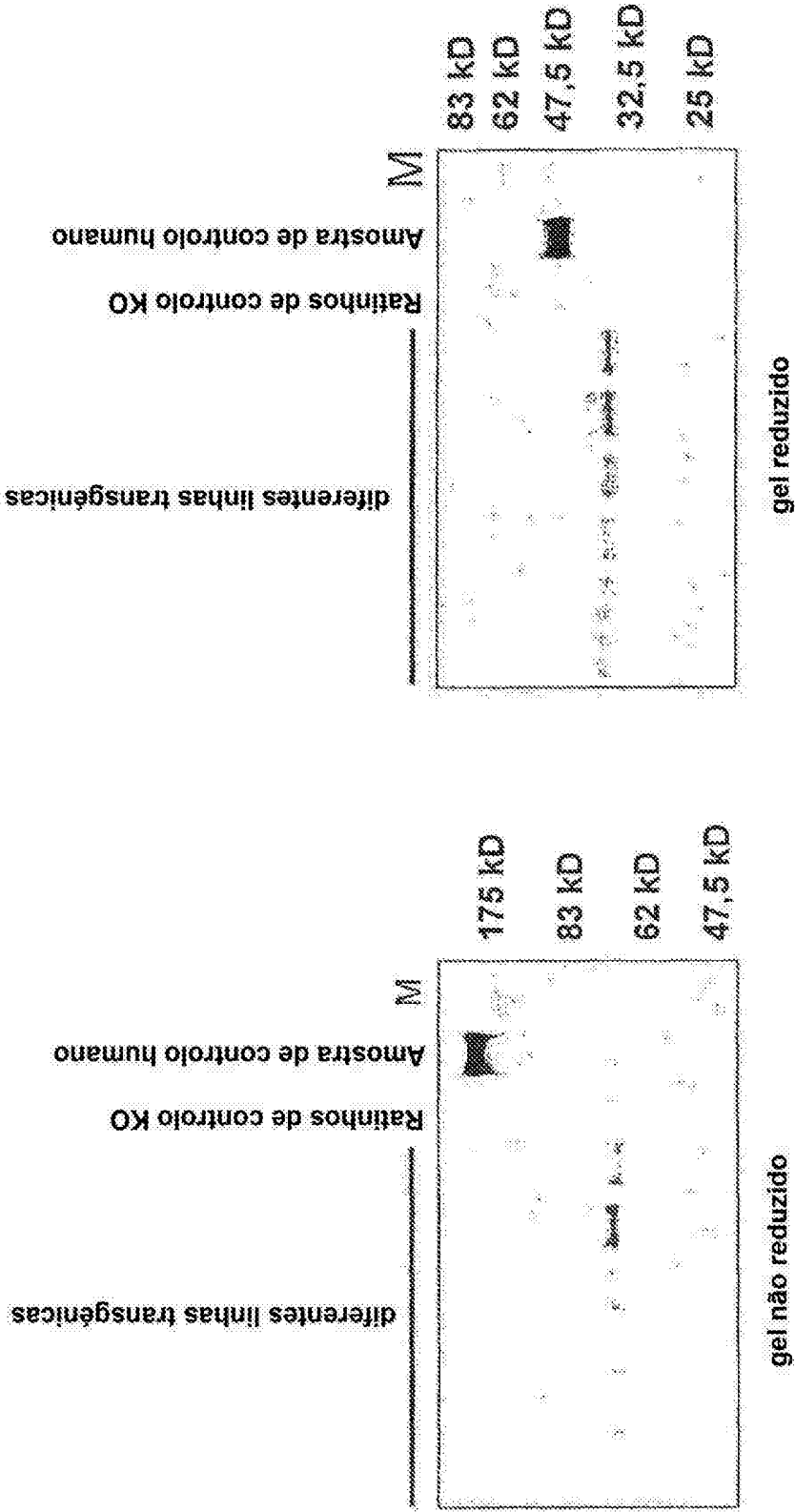


FIG. 14

FIG. 15

Fracionamento do tamanho de IgM humana misturada com IgM de cadeia simples humana produzida por ratinhos de locus de IgM mais IgG

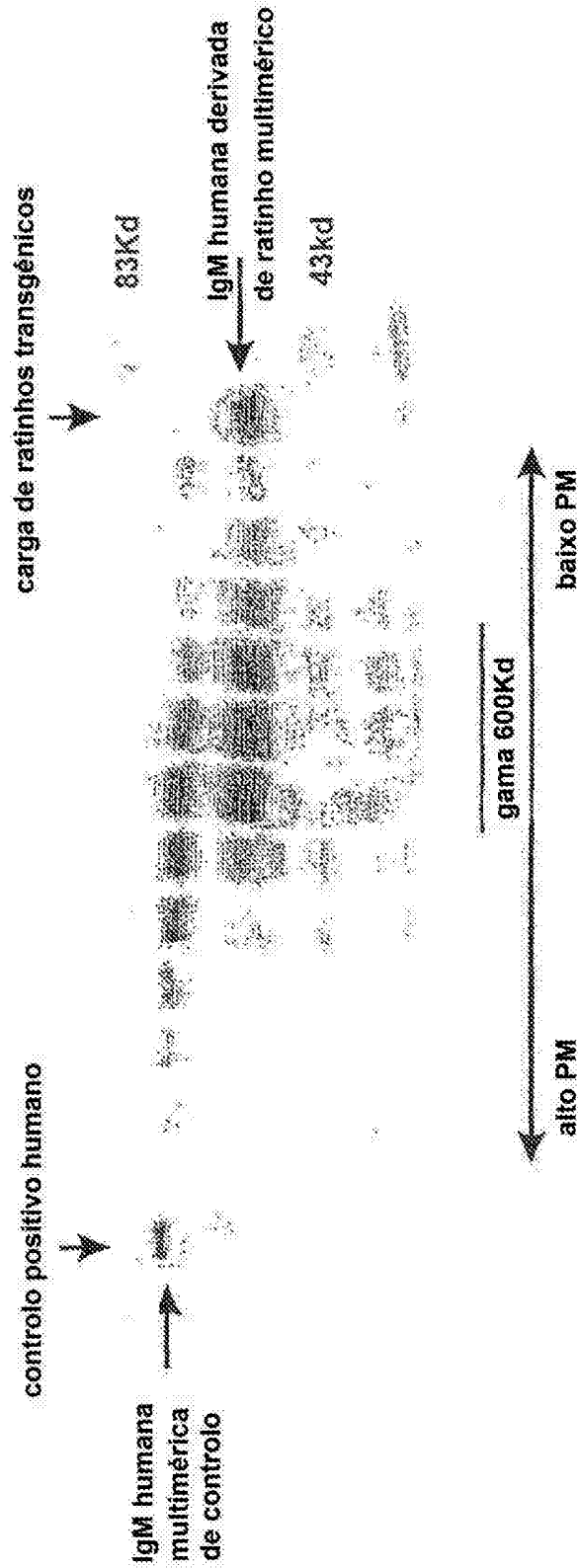
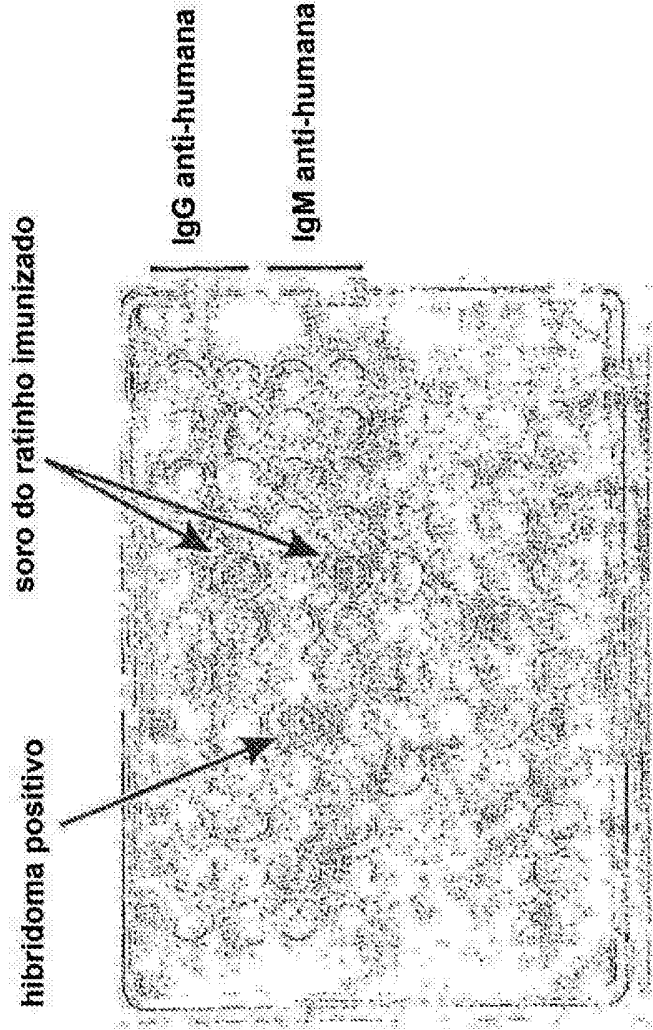


FIG. 16

ELISA de anticorpos de IgG e IgM de cadeia simples gerados contra o $\text{TNF}\alpha$ humano



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

US 5487890 A
WO 02085945 A
WO 02085944 A
US 20030058074 A1
WO 2004049794 A
GB 20030003319 W
GB 0416392 A
GB 0511881 A
EP 05766644 A

Literatura de não patentes citada na Descrição

VAN SPRIEL et al. J. Infect. Diseases, 1999, vol. 179, 661-669
TACKEN et al. J. Immunol., 2004, vol. 172, 4934-4940
GLENNIE ; VAN DER WINKEL. Drug Discovery Today, 2003, vol. 8, 503-5100
VAN SPRIEL et al. Immunol. Today, 2000, vol. 21, 391-397
SEGAL et al. J. Immunol. Methods, 2001, vol. 248, 1-6
LYDEN et al. Nat. Med., 2001, vol. 7, 1194-1201
SURESH et al. Methods Enzymol., 1986, vol. 121, 210-228
CARTER. J. Immunol. Methods, 2001, vol. 248, 7-15
FERGUSON et al. Arthritis and Rheumatism, 1995, vol. 38, 190-200
HOLLIGER et al. PNAS, 1993, vol. 90, 6444-6448
MULLER et al. FEBS Lett., 1998, vol. 422, 259-264

- MULLER et al. FEBS Lett., 1998, 259-264
- HUDSON. Curr. Opin. Immunol., 1999, vol. 11,548-557
- LU et al. J. Immunol. Methods, 2003, vol. 279,219-232
- JATON et al. Biochemistry, 1968, vol. 7, 4185-4195
- HENDERSHOT et al. J. Cell Biol., 1987, vol. 104,761-767
- BRANDT et al. Mol. Cell. Biol., 1984, vol. 4,1270-1277
- WARD et al. Nature, 1989, vol. 341, 544-546
- HAMERS-CASTERMAN et al. Nature, 1993, vol.363, 446-448
- STANFIELD et al. Science, 2004, vol. 305,1770-1773
- DAVIES ; RIECHMANN. Protein Eng., 1996, vol. 9 (6), 531-537
- LUTZ; MUYLDERMANS. J. Immuno. Methods,1999, vol. 231, 25-38
- TANHA et al. J. Biol. Chem., 2001, vol. 276,24774-24780
- YAU et al. J. Immunol. Methods, 2005, vol. 297,213-224
- DESMYTER et al. Nat. Struct. Biol., 1996, vol. 3,803-811
- RIECHMANN ; MUYLDERMANS. J. Immunol. Methods,1999, vol. 23, 25-28
- DE GENST et al. J. Biol. Chem., 2005, vol. 280 (14),14114-14121
- XU; DAVIES. Immunity, 2000, vol. 13, 37-45
- DE GENST et al. J. Biol. Chem., 2005, vol. 280,14114-14121
- VAN DIJK ; VAN DER WINKEL. Curr. Opin. Chem.Biol., 05 August 2001, (4), 368-374
- LEHER et al. Exp. Eye. Res., 1999, vol. 69, 75-84
- RIECHMANN ; MUYLDERMANS. J. Immunol. Methods,1999, vol. 231, 25-38
- DAVIES ; REICHMANN. Protein Eng., 1996, vol. 9(6), 531-537
- SITIA et al. Cell, 1990, vol. 60, 781-790
- BODER; WITTRUP. Nat. Biotechnol., 1997, vol. 15,553-7
- REICHMANN ; MUYLDERMANS. J. Immunol. Methods,1999, vol. 231, 25-38
- SAMBROOK et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- AUSUBEL et al. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1999

PE2311874

-3-

HARLOW ; LANE. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor

MILLS et al. J. Exp Med., 1997, vol. 186 (6), 845-58