

(11) Número de Publicação: **PT 1498427 E**

(51) Classificação Internacional:
C12Q 1/68 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1993.08.18	(73) Titular(es): VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL PLEINLAAN 2 B-1050 BRUSSELS	BE
(30) Prioridade(s): 1992.08.21 EP 92402326 1993.05.21 EP 93401310		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.01.19	(72) Inventor(es): CÉCILE CASTERMAN RAYMOND HAMERS	BE
(45) Data e BPI da concessão: 2009.12.16 055/2010	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **IMUNOGLOBULINAS DESPROVIDAS DE CADEIAS LEVES**

(57) Resumo:

RESUMO

"IMUNOGLOBULINAS DESPROVIDAS DE CADEIAS LEVES"

A invenção refere-se a uma imunoglobulina modificada de 4 cadeias ou fragmento da mesma, cujas regiões V_H foram parcialmente substituídas por sequências específicas ou resíduos de aminoácidos de uma imunoglobulina (a afamada imunoglobulina de cadeia pesada) a qual compreende duas cadeias pesadas de polipéptidos, capazes de reconhecer e ligar um ou vários抗原s, sendo a referida cadeia pesada de imunoglobulina desprovida de cadeias leves.

A invenção refere-se especificamente a fragmentos modificados da região V_H de uma imunoglobulina de quatro cadeias compreendendo resíduos de aminoácidos específicos ou sequências de uma imunoglobulina (a afamada imunoglobulina de cadeia pesada) a qual compreende duas cadeias pesadas de polipéptidos capazes de reconhecer e ligar um ou mais抗原s, sendo a referida cadeia pesada de imunoglobulina desprovida de cadeias leves.

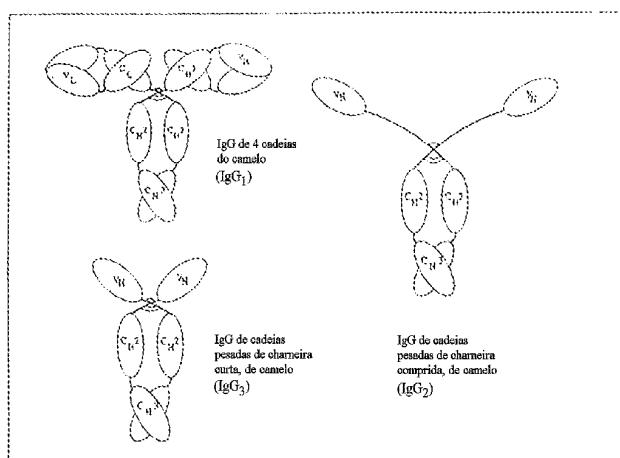


Figura 6: representação esquemática das immunoglobulinas IgG₁ e IgG₂ e IgG₃ putativas. A sequência (Pro-X)₁₂ da molécula IgG putativa pode ser modelada numa repetição 6 aa

DESCRÍÇÃO

"IMUNOGLOBULINAS DESPROVIDAS DE CADEIAS LEVES"

A invenção diz respeito a novas imunoglobulinas isoladas, as quais são desprovidas de cadeias polipeptídicas leves. Estas imunoglobulinas não são produtos de degradação de imunoglobulinas constituídas simultaneamente por cadeias polipeptídicas pesadas e cadeias polipeptídicas leves, sendo antes pelo contrário, tal como definido na invenção, um novo membro da família das imunoglobulinas, especialmente um novo tipo de moléculas capazes de participarem no reconhecimento imunitário. Tais imunoglobulinas podem ser utilizadas para diversos fins, em especial para diagnóstico e para fins terapêuticos, incluindo a protecção contra agentes patológicos ou para regular a expressão ou a actividade de proteínas.

Até ao momento presente, a estrutura proposta para as imunoglobulinas consiste de um modelo de quatro cadeias, respeitantes à presença de duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (cadeias leves) e duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas (cadeias pesadas), ligadas entre si por pontes dissulfureto para formarem macromoléculas em forma de Y ou em forma de T. Estas cadeias são constituída por uma região constante e por uma região variável, sendo a região constante subdividida em vários domínios. As duas cadeias polipeptídicas pesadas estão ligadas normalmente por pontes dissulfureto numa chamada "região de charneira" situada entre o primeiro e o segundo domínios da região constante.

Entre as proteínas que formam a classe de imunoglobulinas, a maior parte delas são anticorpos e consequentemente

apresentam um local de ligação do antigénio ou vários locais de ligação dos antigénios.

De acordo com o modelo de quatro cadeias, o local de um anticorpo de ligação do antigénio está localizado nos domínios variáveis de cada uma das cadeias pesadas e leves e exige a associação dos domínios variáveis das cadeias pesadas e leves.

Para a definição destas imunoglobulinas de modelo de quatro cadeias, faz-se referência à obra de Roitt, L et al. (*Immunology*, segunda edição, Gower Medical Publishing USA, 1989). Merece especial referência a parte respeitante à definição das imunoglobulinas de quatro cadeias, às suas estruturas polipeptídicas e genéticas, à definição das suas regiões variáveis e constantes e à obtenção dos fragmentos produzidos por degradação enzimática, de acordo com técnicas bem conhecidas.

Os inventores concluíram surpreendentemente que é possível isolar moléculas diferentes a partir de animais que as produzem naturalmente, possuindo essas moléculas propriedades funcionais das imunoglobulinas, estando essas funções, em alguns casos, relacionadas com elementos estruturais que são distintos daqueles que estão implicados na função das imunoglobulinas de quatro cadeias, por exemplo, devido à ausência de cadeias leves.

A invenção diz respeito a imunoglobulinas segundo um modelo de duas cadeias, que não correspondem nem aos fragmentos obtidos, por exemplo, pela degradação, em particular a degradação enzimática, de uma imunoglobulina natural de modelo de quatro cadeias, nem correspondem à expressão, em células hospedeiras, do ADN que codifica a região constante ou a região variável de uma imunoglobulina natural de modelo de quatro cadeias, ou de uma parte dessas regiões,

nem corresponde aos anticorpos produzidos em linfopatias, por exemplo, em murganhos, ratos ou seres humanos.

E.S. Ward et al. (1) descreveram algumas experiências efectuadas sobre os domínios variáveis das cadeias polipeptídicas pesadas (V_H) ou/e sobre as cadeias polipeptídicas leves (V_K/F_v), para testar a capacidade destes domínios variáveis para se ligarem a抗igénios específicas. Para o efeito, foi preparado um banco de genes VH a partir de ADN genómico do baço de murganhos previamente imunizados com estes抗igénios específicos.

Ward et al. descreveram, no trabalho que publicaram, que os domínios VH são relativamente aderentes, presumivelmente devido à superfície hidrofóbica exposta, normalmente recoberta pelos domínios VK ou V. Consequentemente admitiram que seria possível conceber domínios VH que tivessem melhores propriedades e presumiram ainda que os domínios VH com actividades ligantes poderiam servir de blocos de construção para a produção de fragmentos variáveis (fragmentos F_v) ou anticorpos completos.

A publicação de Blier P.R. et al. (The Journal of Immunology, vol. 139, 3996-4006, nº 12, 15 de Dezembro de 1987) descreve sequências de nucleótidos incompletas obtidas a partir de hibridomas.

A invenção não parte da ideia de que os diferentes fragmentos (cadeias leves e pesadas) e os diferentes domínios destes fragmentos de imunoglobulina de modelo de quatro cadeias possam ser modificados para se definir novos ou melhores locais de ligação dos抗igénios ou uma imunoglobulina de modelo de quatro cadeias.

Os inventores determinaram que as imunoglobulinas podem ter uma estrutura diferente daquela que está consagrada para o modelo conhecido de quatro cadeias e que essas imunoglobulinas diferentes proporcionam novos meios para a

preparação de reagentes de diagnóstico, agentes terapêuticos ou quaisquer outros reagentes utilizáveis para fins de investigação ou industriais.

Assim sendo, o presente pedido proporciona novas imunoglobulinas que são capazes de apresentar propriedades funcionais das imunoglobulinas do modelo de quatro cadeias, embora a sua estrutura pareça ser mais apropriada, em muitas circunstâncias, para a sua utilização, para a sua preparação e em alguns casos para a sua modificação. No entanto, estas moléculas podem ser consideradas como estruturas de primeiro plano para a modificação de outras imunoglobulinas. As vantagens proporcionadas por estas imunoglobulinas compreendem a possibilidade de as preparar mais facilmente.

As imunoglobulinas preparadas de acordo com a invenção são caracterizadas pelo facto de compreenderem duas cadeias polipeptídicas pesadas, suficientes para a formação de um local de ligação do抗igénio completo ou de vários locais de ligação dos抗igénios, sendo ainda essas imunoglobulinas desprovidas de cadeias polipeptídicas leves. Estas imunoglobulinas caracterizam-se ainda pelo facto de serem o produto da expressão, numa célula hospedeira procariótica ou eucariólica, de um ADN ou de um ADNc que possua a sequência de uma imunoglobulina desprovida de cadeias leves, susceptível de se obter a partir de linfócitos ou outras células de Camelídeos.

As imunoglobulinas descritas podem ser obtidas, por exemplo, a partir de sequências que se encontram descritas na figura 7.

As imunoglobulinas preparadas de acordo com a invenção, as quais são desprovidas de cadeias leves, são tais que os domínios variáveis das suas cadeias pesadas têm propriedades diferentes das observadas no domínio V_H das

imunoglobulinas do modelo de quatro cadeias. O domínio variável da imunoglobulina de cadeia pesada da presente invenção não tem nenhuns locais de interacções normais com os domínios V_L , ou com os domínios C_H1 que não existem nas imunoglobulinas de cadeias pesadas. Trata-se pois de um novo fragmento em muitas das suas propriedades, tais como solubilidade e posição do local de ligação. Por razões de clareza designá-lo-emos por V_{HH} no presente texto para o distinguir do V_H clássico das imunoglobulinas de quatro cadeias.

A expressão "um local de ligação do antigénio completo", de acordo com a presente invenção, designa um local que irá permitir por si só o reconhecimento e a ligação completa de um antigénio. Isto poderia ser verificado por qualquer método conhecido respeitante aos testes de afinidade de ligação.

Estas imunoglobulinas, que podem ser preparadas pela técnica do ADN recombinante ou isoladas a partir de animais, serão designadas por vezes por "imunoglobulinas de cadeias pesadas" nas páginas subsequentes. Preferivelmente, estas imunoglobulinas encontram-se numa forma pura.

O presente pedido descreve as imunoglobulinas que podem ser obtidas em células procarióticas, especialmente em células de *E. coli*, por um processo que compreende os passos seguintes:

- a) efectuar a clonagem, num vector 'Bluescript', de uma sequência de ADN ou de ADNc que codifique o domínio VHE de uma imunoglobulina desprovida de cadeia leves, suscetível de ser obtida, por exemplo, a partir dos linfócitos de Camelídeos,
- b) recuperar o fragmento danado após a amplificação, utilizando um iniciador de 5' que contém um local *Xho* e um

iniciador de 3' que contém o local *Spe* que possui a sequência seguinte:

TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG,

c) clonar o fragmento recuperado em fase no vector 'immuno PBS' após a digestão do vector com as enzimas de restrição *Xho* e *Spe*,

d) transformar células hospedeiras, especialmente de *E. coli*, por transfecção com o vector 'Immuno PBS' recombinante do passo c,

e) recuperar o produto de expressão da sequência de codificação V_{HH} , por exemplo, utilizando anticorpos criados contra o domínio V_{HH} dos dromedários.

O presente pedido descreve as imunoglobulinas que podem ser imunoglobulinas heteroespecíficas que podem ser obtidas por um processo que compreende os passos seguintes:

- obter uma primeira sequência de ADN ou de ADNC que codifique um domínio V_{HH} ou uma parte sua, que tenha uma especificidade determinada contra um determinado抗原 e que esteja compreendido entre os locais *Xho* e *Spe*,

- obter uma segunda sequência de ADN ou de ADNC que codifique um domínio V_{HH} ou uma parte sua, que possua uma especificidade determinada, diferente da especificidade da primeira sequência de ADN ou de ADNC, e que esteja compreendido entre os locais *Spe* e *EcoRI*,

- fazer digerir um vector 'immuno PBS' com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, ligar as sequências de ADN ou de ADNC obtidas, que codificam os domínios V_{HH} , de modo a que as sequências de ADN ou de ADNC sejam clonadas sequencialmente no vector,

- transformar uma célula hospedeira, em especial uma célula de *E. coli*, por transfecção e recuperar as imunoglobulinas obtidas.

O presente pedido descreve também as imunoglobulinas que podem ser obtidas por um processo que compreende os passos seguintes:

- obter uma sequência de ADN ou de ADNc que codifique um domínio V ou uma parte sua, que tenha um local de ligação do抗igenio com uma especificidade determinada,
- amplificar o ADN ou o ADNc obtido, utilizando um iniciador de 5' que contenha um codão de iniciação e um local *HindIII*, e utilizando um iniciador de 3' que contenha um codão de terminação que possua um local *XhoI*,
- efectuar a recombinação do ADN ou do ADNc amplificado no interior dos locais *HindIII* (posição 2650) e *XhoI* (posição 4067) do plasmídeo pMM984,
- efectuar a transfecção de células permissivas, especialmente células NB-E, com o plasmídeo recombinante,
- recuperar os produtos obtidos.

A expressão efectuada com sucesso pode ser verificada com anticorpos dirigidos contra uma região de um domínio V_{HH} , especialmente por meio de um protocolo de EISLE (em inglês ELISA).

De acordo com outro aspecto particular deste processo, as imunoglobulinas são clonadas num parvovíms.

Segundo outro exemplo, estas imunoglobulinas descritas podem ser obtidas por um processo que compreende uma nova clonagem de uma segunda sequência de ADN ou de ADNc que possui outro local determinado de ligação do抗igenio, no plasmídeo pMM984.

Uma tal imunoglobulina pode ainda ser caracterizada pelo facto de haver a possibilidade de a obter por um processo em que o vector é Yep 52 e a célula recombinante transformada é uma levedura, em especial *S. cerevisiae*.

Há uma imunoglobulina descrita particular que se caracteriza pelo facto de possuir uma actividade

catalítica, em especial pelo facto de ser dirigida contra um抗ígeno que simula um estado activado de um determinado substrato. Estes anticorpos catalíticos podem ser modificados ao nível do seu local de ligação, por mutagénese aleatória ou dirigida, com a finalidade de aumentar ou de modificar a sua função catalítica. É possível referir aqui a obra publicada por Lerner *et al.*, ('I IBS, Novembro de 1987, 427-430), a propósito da técnica geral para a preparação de tais imunoglobulinas catalíticas.

De acordo com uma variante descrita preferida, as imunoglobulinas são caracterizadas pelo facto de as suas regiões variáveis conterem, na posição 45, um aminoácido que é diferente de um resíduo leucina, prolina ou glutamina.

Além disso, as imunoglobulinas de cadeia pesada não são produtos característicos de linfócitos de animais nem de linfócitos de um paciente humano que padeça de linfopatias. Tais imunoglobulinas produzidas nas linfopatias são de origem monoclonal e resultam de mutações patogénicas ao nível genómico. Aparentemente não possuem nenhum local de ligação do抗ígeno.

As duas cadeias polipeptídicas pesadas destas imunoglobulinas podem ser ligadas por meio de uma região de charneira, de acordo com a definição de Roitt *et al.*.

De acordo com uma variante particular da presente invenção, as imunoglobulinas correspondentes às moléculas anteriormente definidas são capazes de actuar como anticorpos.

O(s) local(is) das imunoglobulinas descritas, de ligação do(s)抗ígeno(s), estão localizado(s) na região variável da cadeia pesada.

Há um grupo particular destas imunoglobulinas em que cada cadeia polipeptídica pesada possui um local de ligação do antigénio na sua região variável e tais locais correspondem à mesma sequência de aminoácidos.

Noutra variante da presente invenção, as imunoglobulinas preparadas de acordo com a presente invenção caracterizam-se pelo facto de as suas cadeias polipeptídicas pesadas conterem uma região variável (V_{HH}) e uma região constante (C_H) de acordo com a definição de Roitt *et al.*, mas serem desprovidos do primeiro domínio da sua região constante. Este primeiro domínio da região constante é designado por C_{H1} .

Estas imunoglobulinas, que não possuem nenhum domínio C_{H1} , são tais que a região variável das suas cadeias está directamente ligada à região de charneira na parte do terminal C da região variável.

As imunoglobulinas do tipo anteriormente aqui descrito podem englobar as imunoglobulinas de tipo G e em especial as imunoglobulinas que são definidas como imunoglobulinas de classe 2 (IgG2) ou imunoglobulinas de classe 3 (IgG3).

A ausência de cadeias leves e do primeiro domínio constante obriga a uma modificação da nomenclatura dos fragmentos de imunoglobulinas obtidos por digestão enzimática, de acordo com Roitt *et al.*.

Os termos Fc e pFc, por um lado, Fc' e pFc', por outro lado, correspondentes respectivamente aos fragmentos de digestão com papaína e pepsina, são mantidos.

Os termos Fla, $F(la)_2$, $F(la')_2$, Flac, Fd e Fv (em inglês respectivamente Fab, $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, Fabc, Fd e Fv) deixam de ser aplicáveis no seu sentido original, na medida em que tais fragmentos possuem em alternativa uma cadeia leve, a parte variável da cadeia leve ou o domínio C_{H1} .

Os fragmentos obtidos por digestão com papaína e constituídos pelo domínio VHE pela região de charneira passarão a ser designados por $FV_{HH}h$ ou $F(V_{HH}h)_2$, dependendo isso do facto de continuarem ou não ligados por pontes dissulfureto.

Noutra variante da presente invenção, as imunoglobulinas que satisfazem às definições anteriormente aqui apresentadas podem ser obtidas a partir de animais, em especial a partir de animais da família dos Camelídeos. Os inventores concluíram que as imunoglobulinas de cadeia pesada que se encontram presentes nos Camelídeos não estão associadas a uma situação patológica que poderia induzir a produção de anticorpos anormais relativamente às imunoglobulinas de quatro cadeias. Com base num estudo comparativo entre Camelídeos do velho mundo (*Camelus bactrianus* e *Camelus dromedarius*) e Camelídeos do novo mundo (por exemplo, *Lama pacos*, *Lama glama* e *Lama vicugna*), os inventores demonstraram que as imunoglobulinas da invenção, que são desprovidas de cadeias polipeptídicas leves, existem em todas as espécies. Apesar disso, pode haver diferenças no peso molecular destas imunoglobulinas, dependendo isso dos animais. Em especial, o peso molecular de uma cadeia pesada existente nestas imunoglobulinas pode estar compreendido entre cerca de 43 kd e cerca de 47 kd, sendo em particular igual a 45 kd.

De forma vantajosa, as linunoglobulinas de cadeias pesadas da presente invenção são segregadas no sangue dos Camelídeos.

As imunoglobulinas de acordo com esta variante particular da presente invenção podem ser obtidas por purificação a partir de soro de Camelídeos, havendo um processo para a sua purificação que está descrito minuciosamente nos exemplos. No caso em que as imunoglobulinas são obtidas a

partir de Camelideos, as imunoglobulinas não estão no seu ambiente biológico natural.

O presente pedido descreve a imunoglobulina IgG2, quando obtida por purificação a partir do soro de Camelideos, pode ser caracterizada pelos factos seguintes:

- não é adsorvida por cromatografia na coluna de 'Proteína G-Sepharose', é adsorvida por cromatografia numa coluna de 'Proteína A-Sepharose',
- possui um peso molecular de cerca de 100 kd após a eluição com uma solução tampão a pH 4,5 (NaCl 0,15 M com ácido acético a 0,58%, ajustada para o valor de pH igual a 4,5 com NaOH),
- é constituída por cadeias polipeptídicas $\gamma 2$ pesadas com um peso molecular de cerca de 46 kd e preferencialmente 45 kd após redução.

De acordo com o presente pedido, descreve-se um outro grupo de imunoglobulinas, correspondente á IgG3, que podem ser obtidas por purificação a partir do soro de Camelídeos, que se caracterizam pelo facto de uma dessas iminoglobulina ter as particularidades seguintes:

- é adsorvida por cromatografia numa coluna de Proteína A-Sepharose',
- tem um peso molecular de cerca de 100 kd após a eluição com uma solução tampão a pH 3,5 (NaCl 0,15 M com ácido acético a 0,58%),
- é adsorvida por cromatografia numa coluna de 'Proteína G-Sepharose' e a sua eluição tem lugar com uma solução tampão a pH 3,5 (NaCl 0,15 M e ácido acético a 0,58%),
- é constituída por cadeias polipeptídicas $-\gamma 3$ pesadas com um peso molecular de cerca de 45 kd e em particular compreendido entre 43 kd e 47 kd após redução.

Apesar disso, as imunoglobulinas preparadas de acordo com a presente invenção, que são desprovidas de cadeias leves,

possuem nas suas cadeias pesadas uma região constante e uma região variável. A região constante é constituída por diferentes domínios.

A região variável destas imunoglobulinas comprehende armações estruturais (AE, em inglês FW) e regiões determinantes da complementaridade (RDC, em inglês CDR), em especial quatro armações estruturais e três regiões de complementaridade. Distinguem-se das imunoglobulinas de quatro cadeias especialmente pelo facto de esta região variável poder conter, por si própria, um ou vários locais de ligação dos抗énios, sem contribuição da região variável de uma cadeia leve que neste caso não existe.

As sequências de aminoácidos das armações estruturais 1 e 4, comprehendem, entre outras, as sequências de aminoácidos que podem ser seleccionadas respectivamente entre as seguintes:

para o domínio da armação estrutural 1

```

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

```

para o domínio da armação estrutural 4

```

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

```

para o domínio da RDC3

```

A L Q P G G Y C G Y G X - - - - - - - - - C L
V S L M D R I S Q H - - - - - - - - - G C
V P A H L G P G A I L D L K K Y - - - - - K Y
F C Y S T A G D G G S G E - - - - - - - M Y
E L S G G S C E L P L L F - - - - - - - D Y
D W K Y W T C G A Q T G G Y F - - - - - G Q
R L T E M G A C D A R W A T L A T R T F A Y N Y
Q K K D R T R W A E P R E W - - - - - - - N N
G S R F S S P V G S T S R L E S - S D Y - - N Y
A D P S I Y Y S I L X I E Y - - - - - - - K Y
D S P C Y M P T M P A P P I R D S F G W - - D D
T S S F Y W Y C T T A P Y - - - - - - - N V
T E I E W Y G C N L R T T F - - - - - - - T R
N Q L A G G W Y L D P N Y W L S V G A Y - - A I
R L T E M G A C D A R W A T L A T R T F A Y N Y
D G W T R K E G G I G L P W S V O C E D G Y N Y
D S Y P C H L L - - - - - - - - - - - - - D V
V E Y P I A D M C S - - - - - - - - - - - R Y

```

Conforme se disse antes, as imunoglobulinas preparadas de acordo com a presente invenção são preferencialmente desprovidas da totalidade do seu domínio C_H1.

Tais imunoglobulinas possuem domínios C_H2 e C_H3 na região do terminal C relativa à região de charneira.

De acordo com uma variante descrita particular, a região constante das imunoglobulinas compreende os domínios C_H2 e C_H3 constituídos por uma sequência de aminoácidos seleccionada entre as seguintes:

para o domínio C_H2:

APELLGGPTVFI~~F~~PPPKPKDVLSITLTP
 APELPGGPSVFV~~F~~P~~T~~KPKDVLSISGRP
 APELPGGPSVFV~~F~~PPP~~K~~KDVLSISGRP
 APELLGGPSVFIF~~P~~PKDVLSISGRP

para o domínio C_H3:

GQTREPQVYTLA
 GQTREPQVYTLAPXRREL
 GQPREPQVYTLPPSRDEL
 GQPREPQVYTLPPSREEM
 GQPREPQVYTLPPSQEEM

Os inventores demonstraram, de forma interessante, que a região de charneira das imunoglobulinas da invenção pode apresentar comprimentos variáveis. Quando estas imunoglobulinas actuam como anticorpos, o comprimento da região de charneira vai contribuir para a determinação da distância que separa os locais de ligação dos抗ígenos.

Uma imunoglobulina descrita aqui caracteriza-se, preferencialmente, pelo facto de a sua região de charneira possuir entre 0 e 50 aminoácidos.

As sequências particulares da região de charneira das imunoglobulinas descritas são as seguintes:

GTNEVCKCPKCP

ou

EPKIPQPQPQPQPQPQPQPKPEPECTCPKCP.

A região de charneira curta corresponde a uma molécula de IgG3 e a sequência de charneira comprida corresponde a uma molécula de IgG2.

A V_{HH} isolada, obtida a partir de imunoglobulinas de cadeias pesadas, ou os bancos de V_{HH}, correspondentes às imunoglobulinas de cadeias pesadas, podem distinguir-se da clonagem V_{HH} de imunoglobulinas do modelo de quatro

cadeias, com base nas particularidades das sequências que caracterizam as imunoglobulinas de cadeias pesadas.

A região V da imunoglobulina de cadeias pesadas do camelo apresenta diversas diferenças em relação às regiões V_{HH} obtidas a partir de imunoglobulinas do modelo de quatro cadeias pertencentes a todas as espécies examinadas. Ao nível dos resíduos implicados nas interacções de tipo V_{HH}/V_L , foi observada uma diferença importante na posição 45 (AE) que é praticamente sempre leucina nas imunoglobulinas de quatro cadeias (98%), sendo os outros aminoácidos nesta posição a prolina (1%) ou a glutamina (1%).

Na imunoglobulina de cadeias pesadas do camelo, nas sequências examinadas até ao momento presente, apenas se encontrou uma vez o resíduo leucina na posição 45. Poderia ter a sua origem numa imunoglobulina de quatro cadeias. Nos outros casos, este resíduo é substituído por um resíduo arginina, cisteína ou ácido glutâmico. A presença de aminoácidos com carga eléctrica nesta posição deve contribuir para fazer com que a região V_{HH} seja mais solúvel.

A substituição por resíduos específicos dos Camelídeos, tais como os da posição 45, parece ser interessante para a construção de regiões V_{HH} engendradas artificialmente, obtidas a partir do repertório de V_{HH} das imunoglobulinas de quatro cadeias.

Uma segunda particularidade específica do domínio V_{HH} dos camelídeos é a presença frequente de um resíduo cisteína da RDC₃ associado a um resíduo cisteína na posição 31 ou 33 da RDC ou na posição 45 da região AS₂ (em inglês FW₂). A possibilidade de se estabelecer uma ponte dissulfureto entre a RDC₃ e a parte restante do domínio variável poderia contribuir para a estabilidade e para o posicionamento do local de ligação.

Com a excepção de uma única proteína patogénica de mieloína (DAW), nunca uma tal ponte dissulfureto foi encontrada nas regiões V das imunoglobulinas, derivadas de imunoglobulinas de quatro cadeias.

As imunoglobulinas de cadeias pesadas preparadas de acordo com a presente invenção têm também a vantagem particular de não serem viscosas. Assim sendo, estando estas imunoglobulinas presentes no soro, agregam-se muito menos do que as cadeias pesadas isoladas das imunoglobulinas de quatro cadeias. As imunoglobulinas descritas são solúveis até uma concentração superior a 0,5 m/mL, de preferência superior a 1 mg/mL e mais vantajosamente superior a 2 mg/mL.

Estas imunoglobulinas também são portadoras de um exaustivo repertório de ligação de抗énios e experimentam uma maturação de afinidade e de especificidade *in vivo*. Em consequência, permitem isolar e preparar anticorpos com uma especificidade definida, tendo em conta determinados抗énios.

Uma outra propriedade interessante das imunoglobulinas descritas é o facto de poderem ser modificadas e em especial poderem ser humanizadas. De uma forma peculiar, é possível substituir a totalidade ou uma parte da região constante destas imunoglobulinas pela totalidade ou por uma parte de uma região constante de um anticorpo humano. Por exemplo, os domínios C_H2 e/ou C_H3 da imunoglobulina podem ser substituídos pelos domínios C_H2 e/ou C_H3 da imunoglobulina IgG humana de cadeia γ3.

Em tais anticorpos humanizados também é possível substituir uma parte da sequência variável, designadamente um ou vários dos resíduos da annação estrutural que não interfiram no local de ligação, por resíduos humanos da

armação estrutural, ou por uma parte de um anticorpo humano.

Reciprocamente, de acordo com a presente invenção, poderiam ser introduzidas particularidades (em especial fragmentos peptídicos) das regiões VIM das imunoglobulinas de cadeia pesada, nas regiões V_H ou V_L obtidas a partir de imunoglobulinas de quatro cadeias, por exemplo, com a finalidade de se conseguir uma maior solubilidade das imunoglobulinas.

A invenção também diz respeito a um processo para a preparação de um fragmento prode uma imunoglobulina do tipo aqui anteriormente descrito, e em especial diz respeito de um fragmento seleccionado entre o conjunto seguinte e diz respeito a fragmentos assim obtidos:

- um fragmento correspondente a uma cadeia polipeptídica pesada de uma imunoglobulina desprovida de cadeias leves,
- fragmentos obtidos por digestão enzimática das imunoglobulinas da invenção, em especial aqueles que são obtidos por digestão parcial com papaína, dando origem ao fragmento Fc (fragmento constante) e dando origem ao fragmento $FV_{HH}h$ (que contém locais das cadeias pesadas onde se ligam os抗原s) ou o seu dímero $F(V_{HH}h)_2$ ou um fragmento obtido por meio de outra digestão do fragmento Fc com papaína, dando origem ao fragmento pFc correspondente à parte do terminal C do fragmento Fc,
- fragmentos homólogos obtidos com outras enzimas proteolíticas,
- um fragmento que possua pelo menos 20 aminoácidos da região variável da imunoglobulina, ou a região variável completa, em especial um fragmento correspondente aos domínios V_{HH} isolados ou aos dímeros de V_{HH} ligados à ponte dissulfureto da charneira,

- um fragmento corresponde pelo menos a 10 e de preferência a 20 aminoácidos da região constante, ou que corresponda à região constante completa da imunoglobulina. Os fragmentos podem ser obtidos por degradação enzimática ou não enzimática das imunoglobulinas. Também podem ser obtidos por expressão, em células ou era organismos, da sequência de nucleótidos que codifica as imunoglobulinas, ou podem ser sintetizados por via química.

O presente pedido também descreve anticorpos anti-idiotípicos pertencentes às classes das imunoglobulinas de cadeias pesadas. Tais anticorpos anti-idiotípicos podem ser produzidos contra idiotipos humanos ou animais. Uma propriedade destes anticorpos anti-idiotípicos é o facto de poderem ser utilizados como vacinas idiotípicas, em particular para a vacinação conta glicoproteínas ou glicolípidos e se o hidrato de carbono determinar o epítopo.

O presente pedido também descreve anticorpos anti-idiotípicos capazes de reconhecerem os idiotipos de imunoglobulinas de cadeias pesadas.

Tais anticorpos anti-idiotípicos podem ser anticorpos singeneicos ou anticorpos alogeneicos ou anticorpos xenogeneicos.

O presente pedido também descreve sequências de nucleótidos que codificam a totalidade ou uma parte de uma proteína, compreendendo essa sequência de aminoácidos uma sequência de péptidos seleccionados entre os seguintes:

G G S V Q T G G S L R I S C E I S G L T F D
G G S V Q T G G S L R I S C A V S G F S F S

G G S E Q G G G S L R L S C A I S G Y T Y G
 G G S V Q P G G S L T L S C T V S G A T Y S
 G G S V Q A G G S L R L S C T G S G F P Y S
 G G S V Q A G G S L R L S C V A G F G T S
 G G S V Q A G G S L R L S C V S F S P S S

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

A L Q P G G Y C G Y G X - - - - - - - - - C L
 V S L M D R I S Q H - - - - - - - - - G C
 V P A H L G P G A I L D L K K Y - - - - - K Y
 F C Y S T A G D G G S G E - - - - - - - M Y
 E L S G G S C E L P L L F - - - - - - - D Y
 D W K Y W T C G A Q T G G Y F - - - - - G Q
 R L T E M G A C D A R K A T L A T R T F A Y N Y
 Q K K D R T R W A E P R E W - - - - - N N
 G S R F S S P V G S T S R L E S - S D Y - - N Y
 A D P S I Y Y S I L X I E Y - - - - - K Y
 D S P C Y M P T M P A P P I R D S F G W - - D D
 T S S F Y W Y C T T A P Y - - - - - - - N V
 T E I E W Y G C N L R T T F - - - - - T R
 E Q L A G G W Y L D P N Y W L S V G A Y - - A I
 R L T E M G A C D A R K A T L A T R T F A Y N Y
 D G W T R K E G G I G L P K S V Q C E D G Y N Y
 D S Y P C H L L - - - - - - - - - - D V
 V E Y P I A D M C S - - - - - - - - - R Y

APELLGGPSVFVFPKPKDVLSISGXPK
 APELPGGPSVFVPTKPKDVLSISGRPK
 APELPGGPSVFVPPKPKDVLSISGRPK
 APELLGGPSVFIFFFFPKPKDVLSISGRPK
 GQTREPQVYTLAPXRLEL
 GQPREPQVYTLPPSRDEL
 GQPREPQVYTLPPSREEM
 GQPREPQVYTLPPSQEEM
 VTVSSGTNEVCKCPKCPAPELPGGPSVFVFP

ou

VTVSSEPKIPQPQPKPQPQPKPQPKPEPECTCPKCPAPELLGGPSVFIFF
 GTNEVCKCPKCP
 APELPGGPSVFVFP
 EPKIPQPQPKPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP
 APELLGGPSVFIFF

Tais sequências de nucleótidos podem ser deduzidas das sequências de aminoácidos, tendo em consideração a degeneração do código genético. Podem ser sintetizadas ou isoladas a partir de células que produzam as imunoglobulinas da invenção.

Nos exemplos está descrito um procedimento para a obtenção de tais sequências de ADN.

O presente pedido também descreve sequências de ARN, em especial as sequências de ARNm correspondentes a essas sequências de ADN e também correspondentes às sequências de ADNc.

As sequências de nucleótidos ainda podem ser utilizadas para a preparação de iniciadores adequados para detectar ou para pesquisar em células bancos de ADN ou de ADNc para isolar sequências de nucleótidos que codifiquem as imunoglobulinas da invenção.

Tais sequências de nucleótidos podem ser utilizadas para a preparação de vectores recombinantes e para a expressão

dessas sequências, contidas nos vectores, por células hospedeiras, em especial células procarióticas, tais como células de bactérias, ou ainda por células eucarióticas e também, por exemplo, células de OCC (em inglês CHO), células de insectos, células de símios, tais como as células Vero, ou quaisquer outras células de mamíferos. O facto de as imunoglobulinas da invenção estarem desprovidas de cadeias leves permite, em especial, segregá-las em células eucarióticas, uma vez que não é necessário recorrer ao passo que consiste na formação da proteína BIP que é necessária nas imunoglobulinas de quatro cadeias.

As insuficiências dos métodos conhecidos para a produção de anticorpos monoclonais ou imunoglobulinas pela tecnologia do ADN recombinante resultam da necessidade, na grande maioria dos casos, de se clonar simultaneamente os domínios VH e VL correspondentes ao local de ligação específico das imunoglobulinas de quatro cadeias. Os animais, e especialmente os camelídeos que produzem imunoglobulinas de cadeias pesadas de acordo com a invenção, e possivelmente outras espécies de vertebrados, são capazes de produzir imunoglobulinas de cadeias pesadas nas quais o local de ligação está localizado exclusivamente no domínio V_{HH} . Ao contrário de algumas imunoglobulinas de cadeias pesadas produzidas noutras espécies por separação de cadeias ou por clonagem directa, as imunoglobulinas de cadeias pesadas dos Camelideos foram já objecto de uma maturação exaustiva *in vivo*. Além disso, a sua região V evoluiu naturalmente para funcionar na ausência do domínio V_L . Por tal motivo são ideais para a produção de anticorpos monoclonais por meio da tecnologia do ADN recombinante. Uma vez que a obtenção de clones específicos de ligação dos抗igénios não depende de um processo estocástico que necessite de um número muito

grande de células recombinantes, isto permite também um exame muito mais exaustivo do repertório.

Isto pode ser feito ao nível do repertório de V_{HH} não rearranjado, utilizando ADN proveniente de um tipo de células ou de tecidos arbitrariamente escolhidos, ou ao nível do repertório de V_{HH} rearranjado, utilizando o ADN obtido a partir dos linfócitos B. No entanto, é muito mais interessante transcrever o ARNm proveniente das células produtoras dos anticorpos e efectuar a clonagem de ADNe, com ou sem amplificação prévia, num vector adequado. Daqui irá resultar a obtenção de anticorpos que tenham já sido objecto de maturação por afinidade.

O exame de um grande repertório deve demonstrar que é particularmente útil na pesquisa de anticorpos com actividades catalíticas.

Assim, o presente pedido descreve bancos que podem ser gerados de uma forma que inclua parte da sequência de charneira e a identificação é simples uma vez que a charneira está directamente ligada ao domínio V_{HH} .

Estes bancos podem ser obtidos por clonagem de ADNe a partir de células linfóides, com ou sem amplificação prévia por RCP. Os iniciadores de RCP estão localizados nas sequências promotoras, líderes ou da armação estrutural do domínio V no caso do iniciador de 5' e nas regiões de charneira, C_H2 , C_H3 e não traduzida em 3' ou no apêndice poli-A no caso do iniciador de 3'. Uma selecção dimensional do material amplificado permite construir um banco limitado às imunoglobulinas de cadeia pesada.

Como um exemplo particular, utilizou-se o iniciador de 3' a seguir apresentado, no qual foi construído um local *KpnI* e o qual corresponde aos aminoácidos 313 a 319 (CGC CAT CAA GGT AAC AGT TGA), em conjunto com os iniciadores de V_{HH} de murganho, descritos por Sestry e que contêm um local *Xho*

AG GTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG CTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG GTC CAG CTT CTC GAG TCT GG

local *XhoI*

Estes iniciadores geraram um banco de imunoglobulinas de cadeias pesadas de Camelídeos que compreendem a região VHE (relacionada com o subgrupo 111 de murganho ou de seres humanos), a charneira e uma secção de CH₂.

De acordo com outro exemplo, o ADNc é poliadениlado na sua extremidade 5' e os iniciadores de V específicos de murganho são substituídos por um iniciador poli-T e um local *XhoI* permanente, ao nível do nucleótido 12:

CTCGAGT_{I2}.

Utiliza-se o mesmo iniciador de 3' com um local *KpnI*.

Este método gera um banco que contém todos os subgrupos de imunoglobulinas.

Uma parte do interesse na clonagem de uma região que abrange a ligação chameira-CH₂ é o facto de haver nas duas cadeias γ2 e γ3 um local *Sac* imediatamente a seguir à charneira. Este local permite enxertar a sequência codificadora da região V_{HH} e a charneira na região Fe de outras imunoglobulinas, em particular nas IgG1 e IgG3 humanas que têm a mesma sequência de aminoácidos neste local (Glu₂₄₆ Leu₂₄₇).

Como exemplo, o presente pedido descreve um banco de ADNc constituído por sequências de nucleótidos que codificam uma imunoglobulina de cadeias pesadas, tal como a que se obtém executando os passos seguintes:

a) tratar uma amostra que contenha células linfóides, em especial linfócitos periféricos, esplenócitos, nodos linfáticos ou outros tecidos linfóides provenientes de um animal saudável, escolhido especialmente entre os

Camelideos, com a finalidade de separar as células linfóides,

- b) separar o ARN poliadenilado de outros ácidos nucleicos e de outros componentes das células,
- c) fazer reagir o ARN assim obtido com uma transcriptase reversa, com a finalidade de se obter o ADNc correspondente,
- d) fazer contactar o ADNc do passo c) com os iniciadores de 5' correspondentes ao domínio V_H do murganho, da imunoglobulinas de quatro cadeias, possuindo esse iniciador um determinado local de restrição, por exemplo, o local $XbaI$, e com os iniciadores de 3' correspondentes à parte do terminal N de um domínio C_H2 que contenha um local $KpnI$,
- e) amplificar o ADN,
- f) clonar num vector a sequência amplificada, em especial num vector 'Bluescript',
- g) recuperar os clones que hibridem com uma sonda correspondente à sequência codificadora de um domínio constante de uma imunoglobulina de cadeias pesadas que tenha sido isolada.

Esta clonagem permite obter clones que contêm sequências de ADN que compreendem a sequência codificadora da charneira. Esta clonagem permite pois a caracterização da subclasse da imunoglobulina e o local $SacI$ útil para enxertar o fragmento $FV_{HH}h$ na região Fc.

Também é possível efectuar a recuperação das sequências que codificam as imunoglobulinas de cadeias pesadas, por meio da selecção de clones que contenham as sequências de ADN que possuem um local compatível com a falta do domínio C_H1 . De acordo com outra variante do presente pedido, é possível acrescentar, entre os passos c) e d) do processo anterior, os passos seguintes:

- na presença de uma polimerase de ADN e de desoxirribonucleótido-trifosfatos, fazer contactar o referido ADNc com iniciadores oligonucleotídicos degenerados, sendo essas sequências capazes de codificar a região de charneira e o domínio V_{HH} do terminal N de uma imunoglobulina, sendo os iniciadores capazes de hibridar com o ADNc e capazes de iniciar o prolongamento de uma sequência de ADN complementar do ADNc utilizado como matriz,
- recuperar o ADN amplificado.

Os clones podem ser expressos em diversos tipos de vectores de expressão. Como exemplo, utilizando um vector 'Immuno PBS' comercialmente disponível (Huse et al.: Science (1989) 246, 1275), os clones produzidos em 'Bluescript', de acordo com o procedimento anteriormente descrito, são recuperados por RCP utilizando o mesmo iniciador de 5' que contém *XhoI* e um novo iniciador de 3', correspondente aos resíduos 113-103 na armação estrutural das imunoglobulinas, onde foi construído um local *Spe*: TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG. Este procedimento permite a clonagem da região V_{HH} no local *Xho/Spe* do vector 'Immuno PBS'. No entanto, a extremidade 3' do gene não está em fase com o "marcador" de identificação nem com o codão de paragem do vector. Para se conseguir isto, corta-se o arquétipo com *Spe* e faz-se o preenchimento com os apêndices de 4 bases, utilizando o fragmento de Klenow, após o que o vector é novamente ligado. Uma outra operação de refinamento consiste em substituir o identificador ("marcador") com uma polihistidina, de modo a que seja realizada a purificação de metais da região V_{ini} clonada. Para se conseguir isto, constrói-se em primeiro lugar um oligonucleótido de cadeia dupla *SpelEcoRI* que codifica 6 resíduos histidina e um

codão de terminação, por síntese das duas cadeias, a que se segue o tratamento térmico e a recombinação:

CTA GTG CAC CAC CAT CAC CAT CAC TAA* TAG*

AC GTG GTG GTA GTG GTA GTG ATT ATC TTA A.

O vector que contém o segmento intercalar é então digerido com SpeI e EcoRI para a remoção da sequência "marcadora" residente a qual pode ser substituída por uma sequência terminal de poliHis. O domínio VHH produzido pode igualmente ser detectado através da utilização de anticorpos cultivados contra as regiões VHH do camelídeo. Sob condições laboratoriais, as regiões VHH são produzidas no vector Imuno PBS em quantidades em mg por litro.

O presente pedido também descreve um banco de ADN composto por sequências de nucleótidos que codificam uma imunoglobulinas de cadeia pesada, tal como a obtida das células com genes de imunoglobulinas rearranjada.

Numa forma de realização do presente pedido, o banco é preparado a partir de células de um animal previamente imunizado contra um determinado antigénio. Isto permite a selecção de anticorpos com uma especificidade pré-selecionada para o antigénio usado para imunização.

Noutra forma de realização do presente pedido, a amplificação de ADNc não é realizada antes da clonagem do ADNc.

A cadeia pesada das imunoglobulinas de quatro cadeias permanece sequestrada na célula por uma proteína adventícia (BIP) até que seja combinada com uma cadeia leve. O local de ligação para a proteína adventícia é o domínio CH1. Uma vez que este domínio está isento de imunoglobulinas de cadeia pesada, a sua secreção é independente da presença da proteína BIP ou da cadeia leve. Para além disso, os inventores mostraram que as imunoglobulinas obtidas não são

pegajosas e consequentemente não irão agregar-se de modo anormal.

O presente pedido também descreve um processo para a preparação de um anticorpo monoclonal contra um抗ígenio específico, em que o local de aglutinação do抗ígeno consiste em cadeias polipeptídicas pesadas e em que o anticorpo é ainda desprovido de cadeias polipeptídicas leves, o processo compreendendo:

- imortalização de linfócitos, obtidos por exemplo do sangue periférico de camelídeos previamente imunizados com um determinado抗ígeno, com uma célula imortal e de preferência com células mieloma, de modo a realizar um hibridoma,
- cultura das células imortalizadas (hibridoma) formadas e recuperação das células que produzem os anticorpos que possuem a especificidade desejada.

A preparação dos anticorpos pode também ser realizada sem uma imunização prévia dos camelídeos.

De acordo com outro processo para a preparação de anticorpos, não é necessário o recurso à técnica da célula de hibridoma.

De acordo com tal processo, os anticorpos são preparados in vitro e podem ser obtidos por um processo compreendendo as seguintes etapas:

- clonagem em vectores, especialmente em fagos e mais particularmente bacteriófagos filamentosos, sequências de ADN ou ADNC obtidas de linfócitos, especialmente PBLs ou camelídeos previamente imunizados com determinados抗ígenios,
- transformação de células procarióticas com os vectores mencionados em cima, em condições que permitam a produção de anticorpos,
- selecção dos anticorpos pela sua estrutura de cadeia

pesada e adicionalmente através da sua sujeição a selecção por afinidade com antigénio,

- recuperação dos anticorpos com a especificidade desejada,

Noutra forma de realização da invenção, a clonagem é realizada em vectores, especialmente em plasmídeos que codificam proteínas de membrana bacteriana.

As células procarióticas são então transformadas com os vectores mencionados em cima, em condições que permitam a expressão dos anticorpos nas suas membranas.

As células positivas são ainda escolhidas por selecção pela afinidade do antigénio.

Os anticorpos de cadeia pesada que não possuam o domínio C_H1 apresentam uma vantagem distinta nesta matéria. Com efeito, o domínio C_H1 liga-se às proteínas adventícias de tipo BIP presentes em vectores eucarióticos e as cadeias pesadas não são transportadas para fora do retículo endocitoplásmico a não ser que estejam presentes cadeias leves. Significa isto que em células eucarióticas, a clonagem eficiente de imunoglobulinas de quatro cadeias em células que não sejam de mamíferos, tais como as células de leveduras, pode depender das propriedades das proteínas adventícias de tipo BIP residentes e por tal motivo pode ser muito difícil conseguir essa clonagem. A propósito disto, os anticorpos de cadeias pesadas da invenção que não tenham o domínio C_H1 representam uma vantagem distintiva.

Numa variante do presente pedido, é possível realizar a clonagem em leveduras, quer para a produção de anticorpos quer para a modificação do metabolismo das leveduras. Como exemplo, é possível utilizar o vector Yep 52. Este vector tem a origem de replicação (ORI) 2μ. da levedura conjuntamente com um marcador de selecção Leu 2.

O gene clonado está sob o controlo do promotor gall e consequentemente é induzível pela galactose. No entanto, a expressão pode ser reprimida pela glicose, o que permite obter concentrações muito elevadas de células antes da indução.

A clonagem entre locais *Bam*HI e *Sall*, utilizando a mesma estratégia de produção de genes por RCP, tal como a estratégia anterionnente descrita, permite clonar genes de imunoglobulinas de Camelideos em *E. coli*. Como exemplo de modulação metabólica que pode ser conseguida pelos anticorpos e proposta para a levedura, é possível indicar a clonagem de anticorpos dirigidos contra as ciclinas, isto é, proteínas implicadas na regulação do ciclo celular das leveduras (TIBS 16 430 J.D. McKinney, N. Heintz 1991). Outro exemplo é a introdução, por meio de técnicas da engenharia genética, de um anticorpo dirigido contra as CD₂₈, anticorpo esse que poderia ser induzível (por exemplo, por gall), no interior do genoma da levedura. As CD₂₈ têm unia participação ao nível da iniciação da divisão celular e por tal motivo a expressão de anticorpos contra esta molécula poderia permitir um controlo eficiente da multiplicação das células e a optimização de métodos para a produção em biorreactores ou por meio de células imobilizadas.

Ainda de acordo com outra variante do presente pedido, o vector de clonagem é um plasmídeo ou um vector virai eucariótico e as células que irão ser transformadas são células eucarióticas, em especial células de leveduras, células de mamíferos, por exemplo, células de OCC (em inglês CHO) ou células de símios, tais como células Veto, células de insectos, células de plantas ou células de protozoários.

Para saber mais pormenores sobre o procedimento que deve ser aplicado num caso desses, faz-se referência à obra de Marks *et al.*, J. Moi. Biol. 1991, 222:581-597,

Além disso, começando com as imunoglobulinas descritas ou com os seus fragmentos é possível preparar novas imunoglobulinas ou os seus derivados.

Posto isto, é possível preparar imunoglobulinas, que satisfaçam às definições anteriormente apresentadas, contra determinados抗原s. O presente pedido descreve especialmente anticorpos monoclonais ou policlonais desprovidos de cadeias polipeptídicas leves ou anti-soros que contenham tais anticorpos e que são dirigidos contra determinados抗原s, por exemplo, contra抗原s de agentes patológicos, tais como bactérias, vírus ou parasitas. Como exemplos de抗原s ou determinantes抗原icos contra os quais é possível preparar os anticorpos, é possível citar as glicoproteínas do invólucro de vírus ou os seus péptidos, tais como a glicoproteína do invólucro externo do VTE-1 e o抗原 da supe•cie do vírus da hepatite B.

As imunoglobulinas descritas também podem ser dirigidas contra uma proteína, um haptene, um hidrato de carbono ou um ácido nucleico.

Os anticorpos particulares são dirigidos contra o epítopo de galactosil- α -1-3-galactose.

As imunoglobulinas descritas permitem ainda preparar produtos combinados, tais como a combinação da imunoglobulina de cadeias pesadas, ou um seu fragmento, com uma toxina, uma enzima, um fármaco ou uma hormona.

Como exemplo, é possível preparar a combinação de uma imunoglobulina de cadeias pesadas, portadora de um local de ligação de um抗原 que reconheça um epítopo de imunoglobulina de mieloma, com a ab•ina ou a toxina da

lectina de visco-branco. Tal arquétipo pode ter as suas aplicações em terapias específicas de pacientes.

Outra combinação vantajosa é a que resulta da preparação entre uma imunoglobulina de cadeias pesadas, que reconheça um抗ígeno do intestino de insectos, com uma toxina específica para insectos, tal como uma das toxinas dos diferentes serotipos de *Bacillus thuringiensis* ou *Streptomyces sphaericus*. Tal arquétipo clonado em plantas pode ser utilizado para aumentar a especificidade ou a variedade de hospedeiros de toxinas bacterianas existentes.

O presente pedido também proporciona anticorpos que possuem diferentes especificidades em cada cadeia polipeptídica pesada. Estes anticorpos multifuncionais, especialmente bifuncionais, poderiam ser preparados combinando duas cadeias pesadas de imunoglobulinas da invenção ou uma cadeia pesada de uma imunoglobulina da invenção com um fragmento de uma imunoglobulina do modelo de quatro cadeias.

O presente pedido também descreve anticorpos heteroespecíficos que podem ser utilizados para encaminhar fálinacos ou qualquer substância biológica, por exemplo, hormonas. Em particular, podem ser utilizados para encaminhar, de forma selectiva, hormonas ou citoquinas para uma categoria limitada de células. Como exemplos refere-se uma combinação de um anticorpo de murinos ou de seres humanos, criado contra a interleucina 2 (IL₂), e um anticorpo de cadeias pesadas criado contra as células CD₄. Estes anticorpos poderiam ser utilizados para reactivar células CD₄ que tenham perdido o seu receptor de IL₂.

As imunoglobulinas de cadeias pesadas descritas também podem ser utilizadas para a preparação de anticorpos heterespecíficos. Isto pode ser conseguido quer de acordo com o método anteriormente descrito, por redução das pontes

entre as diferentes cadeias e reoxidação, em conformidade com as técnicas habituais, de dois anticorpos que tenham especificidades diferentes, ou então pode ser conseguido efectuando a clonagem sequencial de dois anticorpos, por exemplo, no vector 'Immuno PBS'.

Se for esse o caso, prepara-se um primeiro gene correspondente ao domínio V_{HH} compreendido entre o local *Xho* e o local *Spe*, conforme descrito antes. Depois prepara-se um segundo gene por um método análogo utilizando corno extremidade 5' um iniciador que possua um local *Spe* e utilizando como extremidade 3' um iniciador que possua um codão de terminação e um local *EcoRI*. Depois faz-se digerir o vector com *EcoRI* e *XhoI* e ainda se faz digerir os dois genes de V_{HH} com *Xho/Spe* e *Sp/EcoRI*.

Após a ligação, os dois genes de imunoglobulinas são clonados sequencialmente. O afastamento entre os dois genes pode ser aumentado mediante a introdução de codões de adição dentro do iniciador *SpeI* de 5'.

Numa variante descrita particular, a região de charneira das imunoglobulinas IgG2 é semi-rígida e por isso é adequada para o acoplamento de proteínas. Numa aplicação dessas, as proteínas ou os péptidos podem ser ligados a diversas substâncias, especialmente a ligandos, através da região de charneira utilizada como separador. De forma vantajosa, o fragmento comprehende pelo menos 6 aminoácidos. De acordo com a revelação, é interessante, é utilizar uma sequência que compreenda uma sequência repetida de Pro-X em que o símbolo X designa qualquer aminoácido e de preferência Gln, Lis ou Glu, em especial um tiagmento constituído pelo menos por uma repetição tripla e de preferência por uma repetição dodécupla (12 vezes), para acoplar proteínas ao ligando ou para a montagem de diferentes domínios proteínicos.

Também é possível utilizar a região de charneira ou um seu fragmento para acoplar proteínas aos ligandos ou para a montagem de diferentes domínios proteínicos.

Para o acoplamento são adequadas as técnicas habituais e é possível fazer uma referência especial à técnica de construção de proteínas por montagem de sequências clonadas.

Os anticorpos descritos poderiam ser utilizados como reagentes para diagnóstico *in vitro* ou para a prática de técnicas de imagiologia. As imunoglobulinas poderiam ser marcadas com radioisótopos, marcadores químicos ou enzimáticos ou marcadores quimioluminescentes.

Como exemplo, especialmente no caso da detecção ou da observação com as imunoglobulinas, pelas técnicas de imatologia, é vantajoso utilizar um marcador, tal como o tecnécio, em especial o tecnécio 99. Este marcador pode ser utilizado para orientar a marcação, por meio de um procedimento de acoplamento com as imunoglobulinas ou com os seus fragmentos, ou para a marcação indirecta a seguir a um passo de preparação de um complexo com o tecnécio.

Por exemplo, há outros marcadores radioactivos interessantes, entre os quais se refere o índio e em especial o índio III, ou o iodo, em especial I^{131} , I^{125} e $/I^{123}$.

Para estudo destas técnicas faz-se referência ao pedido de patente de invenção fi⁻ancesa publicada com o nº 2649488.

Nestas aplicações, o tamanho pequeno do fragmento V constitui uma vantagem definitiva para efeitos de penetração nos tecidos.

O presente pedido também descreve anticorpos monoclonais que reagem com anti-idiotipos dos anticorpos descritos antes.

O presente pedido também descreve células ou a organismos em que as imunoglobulinas de cadeias pesadas tenham sido clonadas. Tais células ou organismos podem ser utilizados para a produção de imunoglobulinas de cadeias pesadas que possuam uma especificidade desejada pré-selecionada, ou correspondentes a um repertório particular. Também podem ser produzidas para a modificação do metabolismo das células que as exprimam. No caso de modificação do metabolismo de células transformadas com as sequências que codificam as imunoglobulinas de cadeias pesadas, estas imunoglobulinas de cadeias pesadas assim produzidas são utilizadas como ADN anti-sentido. O ADN anti-sentido está envolvido normalmente no bloqueio da expressão de determinados genes tais como, por exemplo, o antigénio de superfície variável de tripanossomas ou de outros agentes patogénicos. De igual modo, a produção ou a actividade de determinadas proteínas ou enzimas poderia ser inibida mediante a expressão de anticorpos contra essas proteínas ou enzimas no interior da mesma célula.

O presente pedido também descreve uma imunoglobulina de quatro cadeias modificada, ou seus fragmentos, cujas regiões V_H tenham sido parcialmente substituídas por sequências específicas ou aminoácidos de imunoglobulinas de cadeias pesadas, especialmente por sequências de domínio V_{HH} . Há um domínio V_H modificado particular de uma imunoglobulina de quatro cadeias de acordo com a invenção que se caracteriza pelo facto de a leucina, a prolina ou a glutamina na posição 45 das regiões V_1 terem sido substituídas por outros aminoácidos e de preferência por arginina, ácido glutâmico ou cisteína.

Há um outro domínio V_H ou V_L modificado de uma imunoglobulina de quatro cadeias que se caracteriza pela ligação de elos das RDC (em inglês CDR) entre si ou às

regiões da AE mediante a introdução de cisteínas emparelhadas, sendo a RDC escolhida entre a RDC₁ e a RDC₃, e em que a região da AE é a região AE₂, e em especial nos casos em que uma das cisteínas introduzidas está na posição 31 ou 33 da AE₂ ou na posição 45 da RDC₂ e a outra está na RDC₃.

Em especial, a introdução de cisteínas emparelhadas é tal que o elo da RDC₃ está ligado à AE₂ ou ao domínio RDC₁ e mais especialmente a cisteína da RDC₃ da região V_H está ligada a uma cisteína na posição 31 ou 33 da AE₂ ou na posição 45 da RDC₂.

Noutra variante descrita, é possível modificar células de plantas por meio de imunoglobulinas de cadeias pesadas, com a finalidade de lhes conferir novas propriedades ou melhores propriedades.

As imunoglobulinas de cadeias pesadas podem ser utilizadas para a terapia génica do cancro, por exemplo, utilizando anticorpos dirigidos contra as proteínas presentes nas células do tumor.

Em tal caso, é possível conseguir a expressão de um ou dois genes de V_{HH} utilizando vectores obtidos a partir de parvovírus ou adenovírus. Os parvovírus caracterizam-se pelo facto de serem desprovidos de patogenicidade ou tle praticamente não serem patogénicos para as células humanas normais e pelo facto de serem capazes de se multiplicarem facilmente em células cancerosas (Russel S.J. 1990, Immunol. Today II, 196-200).

As imunoglobulinas de cadeias pesadas são clonadas, por exemplo, no interior de locais HindIII/XbaI do plasmídeo infeccioso do vírus MVM dos merinos (pMM984). (Merchlinsky et al., 1983, J. Virol. 47, 227-232) e depois são colocadas sob o controlo do promotor MVM38.

O gene do domínio V é amplificado por RCP utilizando um iniciador de 5' que contém um codão de iniciação e um local *HindIII*, possuindo o iniciador de 3' um codão de terminação e um local *XbaI*.

Este arquétipo é depois inserido entre as posições 2650 (*HindIII*) e 4067 (*XbaI*) do plasmídeo.

A eficiência da clonagem pode ser confirmada por transfecção. O vector que contém o anticorpo é depois introduzido em células permissivas (NB-E) por transfecção. As células são recuperadas ao fim de 2 dias e determina-se a presença de regiões V_{HH} segundo um protocolo de EISLE, utilizando para tal anti-soro de coelho que reage com a parte de V_{HH} .

O presente pedido também diz respeito à preparação de anticorpos catalíticos por caminhos diferentes. A produção de anticorpos dirigidos contra componentes que simulam estados activados de substratos (por exemplo, o vanadato como componente que simula o estado activado do fosfato, com o intuito de se produzir as suas actividades de fosfoesterase, o fosfonato como composto que simula a ligação peptídica, com o intuito de se produzir proteases) permite obter anticorpos que têm uma função catalítica. Outro caminho para se obter tais anticorpos consiste em realizar uma mutagénese aleatória em clones de anticorpos, por exemplo, por RCP, introduzindo bases anormais durante a amplificação dos clones. Estes fragmentos amplificados, obtidos por RCP, são depois introduzidos num vector adequado para clonagem. A sua expressão à superfície das bactérias permite que o substrato detecte clones que possuem actividade enzimática. Estas duas metodologias podem ser combinadas, como é evidente. Finalmente, com base nos dados disponíveis sobre a estrutura, por exemplo, os dados obtidos por cristalografia aos raios X ou por RMN, é

possível comandar as modificações. Estas modificações podem ser realizadas por meio de técnicas habituais da engenharia genética ou por síntese completa. Uma vantagem da região V_{HH} das imunoglobulinas de cadeias pesadas da invenção é o facto de serem suficientemente solúveis.

As imunoglobulinas de cadeias pesadas também podem ser produzidas em células vegetais, em especial em plantas transgénicas. Como exemplo, é possível produzir imunoglobulinas de cadeias pesadas em plantas, utilizando para tal o plasmídeo pMon530 (Roger et al., Meth. Enzym 153 1566 1987). O vector constitutivo de expressão de plantas foi já descrito para anticorpos clássicos do modelo de quatro cadeias (Hiat et al. Nature 342 76-78, 1989), mais uma vez utilizando os iniciadores adequados de RCP, conforme descrito supra, para se gerar um fragmento de ADN na fase correcta.

Há outras vantagens e características da invenção que se tornarão evidentes nos exemplos e na observação das figuras subsequentes.

FIGURAS

Figura 1: características e purificação tia igG de camelo por cromatografia de afinidade sobre Sepharose com Proteína A e com Proteína G (Pharmacia)

A figura 1A mostra, após redução, o perfil da proteína obtida por EGPA-DSS, das fracções adsorvida e não adsorvida de soro de *Camelus dromedarius*. A fracção adsorvida na Proteína A é eluída com NaCl 0,15 M e ácido acético a 0,58% revelou, após redução (pista c), três componentes de cadeia pesada respectivamente com 50, 46 e 43 kd e uma cadeia leve (IgG de coelho na pista a). Às fracções adsorvidas num derivado de 'Sepharose' com Proteína G (Pharmacia), que havia sido concebido artificialmente para suprimir a região de ligação da albumina (pista e) e cuja eluição foi feita

com gli-HCl 0,1 M a pH 2,7, falta-lhes a cadeia pesada de 46 kd que é recuperada na fracção não adsorvida (pista f). Não há nenhum destes três componentes na fracção não adsorvida na Proteína A (pista d); a pista b contém os marcadores de pesos moleculares.

Figuras 1B e 1C. Por eluição diferencial é possível separar as fracções com Proteína G e depois lavou-se exaustivamente a coluna com tampão fosfato 20 mM a pH 7,0. Após a eluição com tampão a pH 3,5 (NaCl 0,15 M e ácido acético a 0,58%), tem lugar a eluição de um componente de 100 kd que após redução dá origem a uma cadeia pesada de 43 kd (pista 1). Depois de a absorvência do eluente da coluna ter caído para o nível natural é possível efectuar a eluição de um segundo componente da imunoglobulina, com um peso molecular de 170 kd, utilizando para tal tampão a pH 2,7 (glicina-HCl 0,1 M). Esta fracção, após redução, dá origem a uma cadeia pesada de 50 kd e a uma faixa de cadeia leve larga (pista 2). A fracção não adsorvida na Proteína G é depois aplicada a uma coluna de .5 mL de 'Sepharose' com Proteína A. Após a lavagem e eluição com tampão a pH 3,5 (NaCl 0,15 M e ácido acético a 0,58%) é possível obter uma terceira imunoglobulina de 100 kd que é constituída exclusivamente pelas cadeias pesadas de 46 kd (pista 3).

Figura 2: imunoglobulinas de *Camelus bactrianus*, *Lama vieugna*, *Lama glama* e *Lama patos* para a Proteína A (pistas A) e para a Proteína G (pistas G) analisadas por EGPA-DSS antes (A) e após redução (B)

Juntou-se 10 µL de soro, proveniente de diferentes espécies, a tubos de Eppendorf que continham 10 mg de 'Sepharose' com Proteína A ou com Proteína G, em suspensão em 400 µL, de tampão de imunoprecipitação a pH 8,3 (NaCl 0,2 M, Tris 0,01 M; EDTA 0,011\4, (Triton X100' a 1% e

ovalbumina a 0,1%). Manteve-se estes tubos a rodar lentamente durante 2 horas a 4°C. Após a centrifugação, as massas obtidas foram lavadas três vezes em tampão e uma vez em tampão em que não havia 'Triton' nem ovalbumina. As massas obtidas foram depois recolocadas em suspensão na solução de amostra de EGPA-DSS, sendo utilizados 70 µL por cada massa na presença ou na ausência de ditiotreitol enquanto agente redutor. Depois de se manter em ebuição durante 3 minutos a 100°C, efectuou-se a centrifugação dos tubos e fez-se uma análise dos sobrenadantes. Em todas as espécies examinadas as fibras acções não reduzidas (A) continham também, para além das moléculas de aproximadamente 170 kd, componentes importantes mais pequenos de aproximadamente 100 kd. Na amostra reduzida (B) são detectadas as cadeias pesadas e leves constituintes. Há em todas as espécies um componente de cadeia pesada (marcado com um asterisco (*)) que se encontra presente no material resultante da eluição da Proteína A, mas que não existe no material da eluição da Proteína G

Figura 3: preparação de IgG₁, IgG₂ e IgG₃ a partir de soro proveniente de *Camelus dromedarius* saudáveis ou infectados com *Trypanosoma evansi* (titulação CATT a 1/160 (3)) e análises feitas por imunoprecipitação ou por autorradio-grafias à Western para pesquisa da actividade anti-tripanossómica

Figura 3A. Acrescentou-se lisado de抗原 de *Trypanosoma evansi* marcados com ³⁵S-metionina (500 000 unidades de contagem) a tubos de Eppendorf que continham 10 µL de soro ou 20 µg de IgG₁, IgG₂ e IgG₃ em 200 µL de tampão de imunoprecipitação a pH 8,3 que continha TLCK 0,1 M, enquanto inibidor das proteinases, e manteve-se os tubos a rodar lentamente a 4°C durante 1 hora. Os tubos

foram depois enriquecidos com 10 mg de 'Sephadex' com Proteína A em suspensão em 200 µL do mesmo tampão a pH 8,3 e ficaram a incubar a 4°C durante mais 1 hora.

Após a lavagem e a centrifugação a 15 000 r.p.m. durante 12 segundos, colocou-se cada massa obtida novamente em suspensão em 75 µL de solução de amostra de EGPA-DSS que continha DTT e aqueceu-se durante 3 minutos a 100°C. Após a centrifugação numa minicentrífugadora de Eppendorf a 15 000 r.p.m. durante 30 segundos, retirou-se 5 µL do sobrenadante para determinação da radioactividade e a parte restante foi analisada por EGPA-DSS e por fluorografia. O número de unidades de contagem de radioactividade por cada 5 µL, de amostra estão inscritos em cada linha.

Figura 3B. Separou-se 20 µg de IgG₁, IgG₂ e IgG₃ provenientes de animais saudáveis e de animais infectados com tripanossomas, recorrendo ao protocolo de EGPA-DSS, sem redução prévia nem aquecimento. As amostras separadas foram então electrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, contrastou-se uma parte da membrana com o corante vermelho de Ponceau para se localizar o material proteínico e a parte restante ficou a incubar com ovalbumina a 1% em tampão TST (Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween a 0,05%) para bloquear os locais de ligação das proteínas.

Após o bloqueio, lavou-se a membrana exaustivamente com tampão TST e manteve-se a incubar durante 2 horas com antigénio de tripanossomas marcado com ³⁵S. Depois de uma lavagem exaustiva, secou-se a membrana e analisou-se por autorradiografia. Para se evitar a ligação natural e de tipo não específico, o uso de tripanossomas marcado foi filtrado através de um filtro de miliporos de 45 µm e manteve-se a incubar com imunoglobulina de camelo saudável e ovalbumina adsorvida sobre uma membrana de nitrocelulose.

Figura 4: a IgG₃ de camelo purificada por cromatografia de afinidade sobre 'Sephadex' com Proteína A é parcialmente digerida com papaina e separada sobre 'Sephadex' com Proteína A

Dissolveu-se 14 mg de IgG₃ purificada em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,0 que continha EDTA 2 mM. Fez-se digerir soro de leite coalhado por incubação durante 1 hora a 37°C com a enzima mercuropapaína (proporção de 1% entre enzima e proteína) activada por cisteína 5 x 10⁻⁴ M. Bloqueou-se a digestão por adição de um excesso de iodoacetamida (4 x 10⁻² M) (13). Após a centrifugação do produto de digestão numa centrifugadora de Eppendorf durante 5 minutos a 15 000 r.p.m., efectuou-se a separação dos fragmentos de papaína numa coluna de 'Sephadex' com Proteína A, em fracções ligantes (L) e não ligantes (NL). A eluição da fracção ligante teve lugar a partir da coluna com tampão de glicina-HCl 0,1 M a pH 1,7.

Figura 5: representação esquemática de um modelo para as moléculas de IgG₃ desprovidas de cadeias leves.

Figura 6: • representação esquemática de imunoglobulinas que possuem cadeias polipeptídicas pesadas e desprovidas de cadeias leves, tendo em conta a imunoglobulina do modelo convencional de quatro cadeias;

- representação de uma região de charneira.

Figura 7: alinhamento de 17 sequências de ADN de Vim de imunoglobulinas de cadeias pesadas do camelo.

Figura 8: expressão e purificação da proteína V_{E111}21 do camelo a partir de *E. coli*.

I ANTICORPOS DE CADEIAS PESADAS NOS CAMELÍDEOS

Quando o soro de *Camelus dromedarius* é adsorvido em 'Sepharose' com Proteína G, há uma quantidade apreciável (25%-35%) de imunoglobulinas (Ig) que ficam em solução e que podem ser depois recuperadas por cromatografia de afinidade sobre 'Sepharose' com Proteína A (figura 1A). A fracção adsorvida na Proteína G pode ser objecto de eluição diferencial no interior de uma fracção coesamente ligada (25%), constituída por moléculas com um peso molecular aparente não reduzido (PM) igual a 170 kd e por uma fracção mais fracamente ligada (30%-45%) que possui um peso molecular aparente igual a 100 kd (figura 1B). O componente de 170 kd, quando reduzido, origina cadeias pesadas de 50 kd e cadeias leves grandes de 30 kd. A fracção de 100 kd é totalmente desprovida de cadeias leves e parece ser constituída exclusivamente por cadeias pesadas que após redução têm um PM aparente igual a 43 kd (figura 1C). A fracção que não se liga à Proteína G pode ser purificada por afinidade e eluida a partir de uma coluna de Proteína A como um segundo componente de 100 kd que após redução parece ser constituído exclusivamente por cadeias pesadas de 46 kd.

As imunoglobulinas de cadeias pesadas desprovidas de cadeias leves perfazem até 75% das moléculas que se ligam à Proteína A.

Uma vez que a totalidade das três imunoglobulinas se liga à Proteína A, referir-nos-emos a elas como IgG: designadamente IgG₁ (γ 1 (50 kd) de cadeias leves e de cadeias pesadas) que se liga à Proteína G, IgG₂ (γ 2 (46 kd) de cadeias pesadas) que não se liga à Proteína G e IgG₃ (γ 3

(43 kd) de cadeias pesadas) que se liga à Proteína G. Há a possibilidade de estas três subclasses ainda poderem ser subdivididas.

Um estudo comparativo entre os Camelídeos do velho mundo (*Camelus bactrianus* e *Camelus dromedarius*) e os Camelídeos do novo mundo (*Lama pacos*, *Lama glama* e *Lama vicugna*) comprovou que as imunoglobulinas de cadeias pesadas existem em todas as espécies examinadas, embora com diferenças irrelevantes na sua proporção e nos seus pesos moleculares aparentes. Os Camelídeos do novo mundo são diferentes dos Camelídeos do velho mundo pelo facto de possuírem uma molécula IgG₃ maior (imunoglobulina de cadeias pesadas que se liga à Proteína G) em que as cadeias pesadas constituintes têm um peso molecular aparente de 47 kd (figura 2).

A abundância de imunoglobulinas de cadeias pesadas no soro dos Camelídeos levanta a questão de se saber qual é o seu papel na resposta imunitária e em particular se são portadoras de especificidade de ligação dos抗énios e em caso afirmativo qual é a extensão do seu repertório. Esta questão pode ser respondida examinando as imunoglobulinas de camelus (*Camelus dromedarius*) infectados com *Dypanasoma evansi*.

Para o efeito, preparou-se as fracções correspondentes de IgG₁, IgG₂ e IgG₃ a partir de soro de um camelo saudável e a partir de soro de camelus com uma elevada concentração de anti-tripanossoma, medida em conformidade com o 'Card Agglutination Test' (3). No ensaio de radioimunoprecipitação, demonstrou-se que as IgG₁, IgG₂ e IgG₃, obtidas a partir de camelus infectados, indicando o repertório extenso de heterogeneidade e de complexidade (figura 3A), se ligam a um grande número de抗énios

presentes num lisado de tripanossomas marcado com ^{35}S -metionina.

Em experiências de obtenção de autorradiografias, o lisado de tripanossomas marcado com ^{35}S -metionina liga-se às IgG₁, IgG₂ e IgG₃, separadas por EGPA-DSS, provenientes de animais infectados (figura 3B).

Isto levou-nos a concluir que as IgG₂ e IgG₃ de cadeias pesadas dos Camelídeos são anticorpos que se ligam a抗原 genuínos.

Há um paradigma imunológico que estabelece que o repertório total de anticorpos é gerado pela combinação dos repertórios da região V variável de cadeias leves e pesadas (6). As imunoglobulinas de cadeias pesadas do camelo parecem contradizer este paradigma.

As imunoglobulinas são caracterizadas por um padrão de focagem isoeléctrica (FIE) complexo, que reflecte a sua heterogeneidade extrema. Para se determinar se as duas cadeias pesadas que constituem as IgG₂ e IgG₃ são idênticas ou não, efectuou-se uma observação do padrão de focagem isoeléctrica (FIE) antes e depois da separação das cadeias por redução e alquilação, utilizando como agente de alquilação a iodoacetamida.

Uma vez que este agente de alquilação não introduz cargas eléctricas adicionais na molécula, os monómeros resultantes da redução e da alquilação do homodímero de cadeias pesadas irá ter praticamente o mesmo ponto isoeléctrico do dímero, ao passo que se fossem derivados de um heterodímero de cadeias pesadas, os monómeros iriam diferir, na maior parte dos casos, suficientemente no ponto isoeléctrico para gerarem um padrão diferente no FIE.

Após a redução e a alquilação com iodoacetamida, o padrão observado não é modificado no caso das IgG₂ e IgG₃ de *Camelus dromedarius*, o que indica que cada uma destas

moléculas é constituída por duas cadeias pesadas idênticas que migram para a mesma posição para que migra a molécula não reduzida onde tiveram a sua origem.

Pelo contrário, o padrão de FIE da IgG₁ é completamente modificado após a redução, uma vez que o ponto isoeléctrico de cada molécula é determinado pela combinação dos pontos isoeléctricos das cadeias leves e pesadas, migrando qualquer uma delas, após a separação, para uma posição diferente. Estes resultados indicam que as cadeias pesadas por si sós podem gerar um repertório extenso e por em causa a contribuição da cadeia leve para o repertório de anticorpos úteis. Se esta necessidade for negada, fica por saber qual o papel que a cadeia leve desempenha.

Normalmente, a cadeia pesada isolada a partir de imunoglobulinas de mamíferos tem tendência para se agregar de forma considerável, mas apenas é solubilizada pelas cadeias leves (8, 9) que se ligam ao domínio C_H1 da cadeia pesada.

Nos seres humanos e nos murganhos há diversos mielomas espontâneos ou induzidos que produzem uma imunoglobulina patológica constituída exclusivamente por cadeias pesadas (doença das cadeias pesadas). Estas cadeias pesadas das proteínas dos mielomas contêm supressões nos domínios C_H1 e V_{HH} (10). O motivo pelo qual as cadeias pesadas de comprimento completo não originam cadeias pesadas segregadas em tais imunoglobulinas patológicas parece ficar a dever-se ao facto de a síntese de Ig necessitar de uma proteína adventícia, a proteína de ligação de cadeias pesadas da imunoglobulina ou BIP (11), que é normalmente substituída pela cadeia leve (12). É possível que o papel primordial da cadeia leve nas imunoglobulinas do modelo de quatro cadeias seja o de uma proteína adventícia de cadeia

pesada comprometida e que a emergência dos repertórios de cadeias leves tenha sido mesmo um bónus evolutivo.

As cadeias γ_2 e γ_3 dos Camelídeos são consideravelmente mais curtas do que a cadeia γ normal dos mamíferos. Isto poderia sugerir a hipótese de terem ocorrido supressões no domínio C_{H1} . As diferenças dos tamanhos das imunoglobulinas γ_2 e γ_3 dos Camelídeos do velho mundo e do novo mundo sugerem que as supressões ocorreram em diversos passos evolutivos, especialmente no domínio C_{H1} .

II FALTA O DOMÍNIO C_{H1} ÀS IMUNOGLOBULINAS DE CADEIAS PESADAS DOS CAMELÍDEOS

A estratégia seguida na investigação da estrutura primária das imunoglobulinas de cadeias pesadas é uma combinação da sequenciação de proteínas e da sequenciação de ADNc; a sequenciação de proteínas é necessária para identificar os segmentos de sequências característicos de cada imunoglobulina. Sendo o terminal N da imunoglobulina derivado da região variável da cadeia pesada, o repertório apenas fornece informação sobre os subgrupos V_{HH} (região variável da cadeia pesada) e não pode ser utilizado para identificação da classe ou da subclasse. Significa isto que é necessário obter dados das sequências a partir de locais internos de clivagem enzimática ou química.

Uma combinação de digestão com papaína e cromatografia por afinidade com Proteína A permitiu fazer a separação de diversos fragmentos que fornecem informação sobre a estrutura geral da IgG₃.

A IgG₃ do camelo (*Camelus dromedarius*), purificada por cromatografia de afinidade sobre 'Sepharose' com Proteína A, foi parcialmente digerida com papaína e o produto da digestão foi separado sobre 'Sepharose' com Proteína A, tendo sido obtidas as fracções de ligação e de não ligação.

Estas fracções foram analisadas por EGPA-DSS em condições redutoras e não redutoras (figura 4).

A fracção ligada continha dois componentes, um de 28 kd e um de 14,4 kd, para além do material não clivado ou parcialmente clivado. Essas fracções foram bem separadas por electroforese em gel (a partir de geles preparativos de EGPA-DSS a 19%), em condições não redutoras, e foram ainda purificadas melhor por electroeluuição (em bicarbonato de amónio 50 nM e DSS a 0,1% (p/v), utilizando um dispositivo de electroeluuição da 'BioRad'). Após a liofilização destas fracções electroeluídas, eliminou-se a parte remanescente do DSS fazendo precipitar a proteína por adição de etanol a 90% e misturando e mantendo a mistura a incubar de um dia para o outro a -20°C (14). A proteína precipitada foi recolhida numa massa combinada por centrifugação (15 000 r.p.m. durante 15 minutos) que foi utilizada para a sequenciação proteinica. Efectuou-se a sequenciação do terminal N utilizando a química de Edman para um sequenciador automático de proteínas em fase líquida, em regime pulsatório, da 'Applied Biosystem 477A'. Os aminoácidos foram identificados pelos seus derivados de fenil-tio-hidantoína (PTH), tendo para tal sido utilizado o analisador de modelo 120 PTH da Applied Biosystem. Todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos á empresa Applied Biosystem A análise dos dados cromatográficos foi realizada utilizando a versão informática 1.61 da Applied Biosystems. Em todos os casos, a análise das sequências, auxiliada por computador, foi confirmada por inspecção directa dos cromatogramas resultantes do analisador de PTH. Dissolveu-se amostras da proteína sequenciada alternativamente em ácido trifluoroacético (ATF) a 50% (v/v) (fragmento de 28 kd) ou em ATF a 100% (fragmento de 14 kd). As amostras de equivalente proteínico dissolvido

para 2000 pmol (fragmento de 28 kd) ou para 500 pmol (fragmento de 14 kd) foram aplicadas sobre discos de fibras de vidro, tratados com ATF. Os discos de fibras de vidro foram recobertos com BioBerne (3 mg) e tratados em pré-ciclo uma vez antes da sua utilização.

A sequenciação do terminal N do fragmento de 28 kd gera uma sequência homóloga da parte do terminal N do domínio $\gamma C_H 2$ e portanto homóloga da extremidade do terminal N 46 do fragmento P_c. A sequência do terminal N do fragmento de 14,4 kd corresponde à última lisina de um domínio $\gamma C_H 2$ e à extremidade do terminal N de um domínio $\gamma C_H 3$ (quadro 1). O peso molecular (PM) dos fragmentos obtidos com papaína e a identificação das suas sequências do terminal N leva-nos a concluir que os domínios $C_H 2$ e $C_H 3$ das cadeias pesadas $\gamma 3$ têm um tamanho normal e que a supressão deve ocorrer quer no domínio $C_H 1$ quer no domínio V_{HH} para gerar a cadeia $\gamma 3$ mais curta. As fracções que não se ligam à Sepharose' com Proteína A contêm duas bandas de 34 kd e 17 kd que são mais difusas no EGPA-DSS, indicando isso que a sua origem está na parte variável do terminal N da molécula (figura 4).

Após a redução, observa-se a existência de uma única banda difusa de 17 kd, o que indica que a banda de 34 kd é um dímero do componente de 17 kd ligado por pontes dissulfureto. O fragmento de 34 kd contém aparentemente o domínio V_{HH} da charneira e do terminal N.

Os dados da sequência da proteína podem ser utilizados para a construção de iniciadores oligonucleotídicos degenerados que facilitam a amplificação de ADNc ou de ADN genómico por RCP.

Demonstrou-se que os esplenócitos de camelo marcam as células que reagiram com os soros de coelho e com os soros anti-imunoglobulina de camelo e que por tal motivo o baço é um local de síntese, pelo menos de uma classe de

imunoglobulinas. O ADNC foi pois sintetizado a partir de ARNm do baço de camelo. As condições para o isolamento do ARN foram as seguintes: isolou-se ARN total a partir de baço de dromedário, pelo método do isotiocianato de guanidínio (15). Purificou-se o ARNm com esférulas paramagnéticas-oligoT.

Consegue-se sintetizar o ADNC utilizando 1 µg de matriz de ARNm, um iniciador oligo-dT e transcriptase reversa (BOEHRINGER MAN). A segunda cadeia do ADNC é obtida utilizando RNase H e polimerase I do ADN de *E. coli*, em conformidade com as instruções do fornecedor.

As sequências relevantes foram amplificadas por RCP: amplificou-se 5 ng de ADNC por RCP numa mistura de reacção de 100 µL (Tris 10 mM-HCl a pH 8,3, KCl 80 mM, MgCl₂ 15 mM, gelatina a 0,01% (p/v), 200 µmol de cada um dos dNTP e 25 pmol de cada iniciador) recoberta com óleo mineral (Sigma).

Os iniciadores degenerados, contendo os locais EcoRI e KpnI, foram ainda clonados no interior do pUC 18. Após um tratamento de desnaturação e de recombinação (a 94°C durante 5 minutos e a 54°C durante 5 minutos), acrescentou-se 2 unidades de polimerase de ADN de Taq à mistura de reacção antes de a submeter a 35 ciclos de amplificação: 1 minuto a 94°C (desnaturar), 1 minuto a 54°C (recombinar) e 2 minutos a 72°C (alongar). Para se amplificar as sequências de ADN entre os domínios V_{HH} e C_H2 (clones da série nº 72), efectuou-se a RCP nas mesmas condições com a excepção de se ter aumentado para 60°C a temperatura de recombinação.

Um dos clones examinados (#56/36) tinha uma sequência correspondente à parte do terminal N de um domínio C_H2 idêntico à sequência do fragmento de 28 kd. A disponibilidade de dados desta sequência permitiu construir

um iniciador de 3' exacto e a clonagem da região da extremidade do terminal N entre os domínios V_{HH} e C_H2 .

Os iniciadores de 5', correspondentes ao domínio V_{HH} de murganho (16) e que contêm um local de restrição $XhoI$, foram utilizados em conjunto com o iniciador de 3' em que havia sido inserido um local $KpnI$ e as sequências amplificadas foram clonadas no interior do vector 'pBluescript®'. Fez-se digerir o clone #56136, que havia revelado dois locais internos $HaeIII$, com esta enzima para se obter uma sonda para identificar os clones positivos na RCP.

Após a amplificação, os produtos da RCP foram confirmados sobre um gel de agarose a 1,2% (p/v). A limpeza dos produtos da RCP consistiu numa extracção com fenol-clorofórmio a que se seguiu outra purificação por CLER (coluna de tipo 'GEN-PAC FAX', Waters) e finalmente mediante a utilização do estojo 'MERMAID' ou 'GENECLEAN II', (BIO 101, Inc.). A seguir a estes passos de purificação, fez-se digerir então o ADNc amplificado, tendo a digestão sido feita com $EcoRI$ e $KpnI$ para os clones da série nº 56 e com $XhoII$ e $KpnI$ para os clones da série nº 72. Fez-se uma extracção final com fenol-clorofórmio a anteceder a ligação no interior do pUC18 (clones da série nº 56) ou no interior de 'pBluescribe (clones da série nº 72).

Todos os clones obtidos tinham menos do que os 860 pares de bases que seria de esperar se possuissem uma região completa V_{HH} e C_H1 . Os dados parciais da sequência, correspondentes ao terminal N da região V_{HH} , revelam que em 20 clones havia 3 que eram idênticos e possivelmente não eram independentes. As sequências obtidas assemelhara-se ao subgrupo III humano e aos subgrupos lila e IIIb dos murinos (quadro 2).

Foram obtidos clones correspondentes a dois conjuntos diferentes de sequências de proteínas de domínio C_H2. Um primeiro conjunto de sequências (#72/41) possuía uma região C_H2 do terminal N idêntica àquela que foi obtida por sequenciação dos fragmentos de 28 kd da cadeia pesada γ3 das proteínas, obtidos com papaina, possuía uma região de charneira curta com 3 resíduos cisteína e uma região variável correspondente aos resíduos da armação estrutural (AE4, em inglês FR4) codificados pelos minigenes J adjacentes à charneira. Faltava-lhes totalmente o domínio C_H1. Este ADNc corresponde à cadeia γ3 (quadro 4).

Numa sequência estreitamente afim (#72/1) a prolina na posição 259 é substituída por treonina.

A sequência correspondente à região C_H3 e a parte restante da região C_H2 foram obtidas por RCP realizada com o ADNc, utilizando como iniciador de KpnI um poli-T em cuja extremidade 5' foi inserido um local de restrição KpnI. A sequência total d cadeia γ3 corresponde a um peso molecular (PM) que concorda bastante bem com os dados obtidos com o protocolo de EGPA-DSS.

A sequência desta cadeia γ3 apresenta semelhanças com outras cadeias γ7, com a exceção de lhe faltar o domínio C_H1, estando o domínio V_{HH} adjacente à charneira.

Um, ou a totalidade dos três resíduos cisteína, pode provavelmente ser responsável por manter unidas as duas cadeias γ3.

Estes resultados permitiram-nos definir um modelo para a molécula IgG₃, com base na sequência e clivagem com papaina (figura 5). A papaina pode clivar a molécula em cada lado das pontes dissulfureto da charneira e também entre os domínios C_H2 e C_H3. Em condições não redutoras, os domínios V_{HH} da IgG₃ podem ser isolados sob a forma de um dímero ligado por pontes dissulfureto ou sob a forma de um

monómero, consoante o local onde a papaína realize a clivagem.

Há um segundo conjunto de clones #72/29 que tem uma sequência ligeiramente diferente para o domínio C_H2 e que foi caracterizado por uma charneira muito comprida precedida imediatamente pelo domínio variável. Esta região da charneira possui três resíduos cisteína na extremidade do seu terminal C numa sequência homóloga com a da charneira γ3. Esse segundo conjunto de clones pode representar eventualmente a subclasse de IgG₂. Para a parte constante da cadeia γ3 e também para a cadeia γ2 putativa, a maior parte dos clones são idênticos, revelando sequências específicas das cadeias γ2 ou γ3. No entanto, há alguns clones, tais como o #7211, que revelam diferenças menos significativas. Por exemplo, no caso dos clones #72/1, são detectadas duas diferenças nos nucleótidos.

Foram agora sequenciados total ou parcialmente vários ADNc de regiões VHH, com a exceção de um troço curto na extremidade do terminal N, que deriva do iniciador.

Após a tradução, a maior parte revela as sequências características Ser₂₁ Cis₂₂ e Tir₉₀ Tir₉₁ Cis₉₂ das cadeias pesadas da ponte dissulfureto da infra-região V_{HH} que liga os resíduos 22 e 29. Todos estes clones têm uma sequência correspondente aos resíduos da armação estrutural 4 (AE4, em inglês FR4) da região variável que precede imediatamente a sequência de charneira postulada (quadro 3). Esta sequência é gerada pelos minigenes J e é, na maior parte dos casos, semelhante à sequência codificada pelos minigenes J dos seres humanos e dos murinos. O comprimento da sequência entre as regiões Cis₉₂ e a extremidade do terminal C das regiões V_{HH} é variável e nas sequências determinadas varia entre 25 e 37 aminoácidos, conforme

seria de esperar dos rearranjos dos minigenes J e D a variar de comprimento.

Surgem várias questões importantes levantadas pela existência única destas imunoglobulinas de cadeias pesadas numa situação não patológica. Acima de tudo, serão anticorpos genuínos? As imunoglobulinas de cadeias pesadas, obtidas a partir de camelus infectados com tripanossomas, reagem com um grande número de抗ígenos parasitas, conforme se demonstra na parte 1 destes exemplos. Isto implica que o sistema imunitário dos Camelídeos gera um número grande de locais de ligação constituídos por domínios V_{HH} singulares. Isto é confirmado pela diversidade das regiões V_{HH} das imunoglobulinas de cadeias pesadas obtidas por RCP.

A segunda questão é "como são segregadas?". A segregação de cadeias pesadas das imunoglobulinas, que constituem as imunoglobulinas do modelo de quatro cadeias, não ocorre em condições normais. Há uma proteína adventícia, a proteína de ligação de cadeias pesadas, ou proteína BIP, que impede a segregação das cadeias pesadas. A segregação apenas pode ocorrer (13) quando a cadeia leve desloca a proteína BIP no retículo endoplasmático.

A dímero de cadeias pesadas encontrado no soro de seres humanos ou de murganhos, que padeçam da chamada "doença das cadeias longas", falta-lhes os domínios C_{H1} que se presume que acomodem o local BIP (14). Na ausência deste domínio, a proteína BIP deixa de poder ligar-se e de impedir o transporte das cadeias pesadas.

A presença de uma classe de IgG 1 nos camelus, constituída por cadeias pesadas e leves que representam uma quantidade compreendida entre 25% e 50% das moléculas totais de IgG, levanta também o problema do modo como a maturação e o desvio de classe ocorre e ainda sobre o papel desempenhado

pela cadeia leve. A cadeia leve dos Camelídeos parece ser invulgarmente grande e heterogénea quando examinada por EGPA-DSS.

A maior dimensão de um domínio isolado é de 40 Å e o intervalo máximo que se consegue entre os locais de ligação de uma IgG convencional com domínios C_H1 e V_{HH} irá ser da ordem de 160 Å ($2V_{HH} + 2C_H1$) (19). A supressão do domínio CH1 nos dois tipos de anticorpos de cadeias pesadas desprovidos de cadeias leves, já sequenciados, tem consequentemente uma modificação do seu intervalo máximo (figura 6). Na IgG₃ a distância máxima entre as extremidades das regiões VHH irá ser da ordem de 80 Å ($2V_{HH}$). Isto poderia ser uma grave limitação à aglutinação ou à interligação. Na IgG₂ isto é compensado pelo troço extremamente longo da charneira, constituído por uma repetição, que ocorre 12 vezes, da sequência Pro-X (em que o símbolo X representa Gln, Lis ou Glu) e que fica localizada do lado do terminal N em relação às pontes dissulfureto da charneira. Pelo contrário, na IgG₃ humana, a charneira muito comprida que aparentemente surge também corno resultado de duplicação das sequências, não contribui para aumentar a distância existente entre os dois locais de ligação, uma vez que esta charneira está intercalada com pontes dissulfureto.

O domínio V_{HH} singular também poderia permitir provavelmente, de uma forma considerável, a liberdade rotacional do local de ligação em relação ao domínio Fc.

Ao contrário das cadeias pesadas dos mielomas, que resultam provavelmente da supressão do domínio C_H1 numa célula produtora de um anticorpo singular, ou de anticorpos de cadeias pesadas produzidos por clonagem de expressão (15), os anticorpos de cadeias pesadas dos Camelídeos (desprovidos de cadeias leves) surgiram num ambiente

imunológico normal e presume-se que tenham experimentado um refinamento selectivo em termos da especificidade e da afinidade associadas à maturação das células B.

Expressão e purificação da proteína V_{HH}21 do camelo (RD21 na figura 7), a partir de *E. Coli*

Os clones podem ser expressos em vários tipos de vectores de expressão. Como exemplo, utilizando um vector 'Inirnuno PBS' comercialmente disponível (Huse et al: Science (1989) 246, 1275) foram obtidos clones, produzidos em 'Bluescribe', em conformidade com o procedimento anteriormente descrito, por meio de RCP, utilizando o mesmo iniciador de 5' que contém o local *Xhol* e um novo iniciador de 3', correspondente aos resíduos 113-103 na armação estrutural das imunoglobulinas, onde foi construído um local *Spe*: TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TU. Este procedimento permite a clonagem do domínio V_{HH} no local *Xho/Spe* do vector Immuno PBS'. No entanto, a extremidade 3' do gene não estava em fase com o "marcador" de identificação nem com o codão de paragem do vector. Para se conseguir isso, cortou-se o arquétipo com *Spe* e as 4 bases sobressalientes foram preenchidas utilizando o fragmento de Klenow e depois disso ligou-se novamente o vector.

O vector de expressão plasmídico 'ipBS' ('immunopBS') (Stratacyte) contém uma sequência líder pelB que é utilizada para a expressão das cadeias da imunoglobulina em *E. coli* sob o controlo do promotor pLAC, um local de ligação dos ribossomas e os codões de paragem. Além disso, contém uma sequência para um marcador decapeptídico do terminal C.

A estirpe JM 101 de *E. coli*, que acomoda o plasmídeo ipBS-V_{HH}21, desenvolveu-se em 1 L de meio constituído por CT (em inglês TB) com ampicilina na concentração de 100 µg/mL e 0,1% de glicose a 32°C. A expressão foi induzida pela

adição de IPTG 1 mM (concentração final) para um valor da D₀₅₅₀ igual a 1,0. Após a indução de um dia para o outro a 28°C, efectuou-se a colheita das células por centrifugação a 4000 x g durante 10 minutos (4°C), tendo sido recolocadas em suspensão em 10 mL de tampão TES (Tris 0,1 M-HCl a pH 8,0, EDTA 0,5 mM e sacarose 0,5 M). Manteve-se a suspensão em gelo durante 2 horas. Efectuou-se a remoção das proteínas periplásmicas por choque osmótico mediante a adição de 20 mL de tampão TES diluído a 1:4 v/v com água, manteve-se em gelo durante 1 hora e depois centrifugou-se a 12 000 x g durante 30 minutos a 4°C. Efectuou-se a diálise da fracção periplásrica do sobrenadante em presença de Tris-HCl a pH 8,8, NaCl 50 mM, aplicou-se a uma coluna de escoamento rápido de tipo 'Q-Sepharose (Pharmacia)', lavou-se com o tampão anteriormente referido e realizou-se a eluição com um gradiente linear de NaCl a variar desde 50 mM até 1 M no tampão.

As fracções que continham a proteína V_{HH} ainda foram purificadas numa coluna de 'Superdex 75' (Pharmacia) equilibrada com tampão STP (fosfato 0,01 M a pH 7,2 e NaCl 0,15 M). A produção de proteína VHM purificada varia entre 2 e 5 mg/L de cultura de células.

As fracções foram analisadas por EGPA-DSS (1). A identificação positiva do fragmento do anticorpo de V_{HH} do camelo foi feita por análise das autonadrografias de Westem, utilizando um anticorpo criado em coelhos na presença de IgG₃ de camelo purificada e um conjugado de anti-IgG do coelho/fosfatase alcalina (2).

Como proteínas padrão (Pharmacia), foram utilizadas proteínas periplásmicas preparadas a partir de 1 mL de JM101/ipBS-V_{HH}21 com a indução feita com IPTG. A figura 8 mostra o seguinte: C,D: fracções provenientes da cromatografia em coluna de escoamento rápido sobre 'S-

Sepharose' (C: eluição feita com NaCl 650 mM, D: eluição feita com NaCl 700 mM); E,F: fracções provenientes da cromatografia em coluna de 'Superdex 75'.

Conforme se pode ver, a impureza principal é eliminada por cromatografia de permuta iônica e a maior parte das impurezas restantes são eliminadas por filtração através de gel.

		250	260	270
Camelot	γ_3 28Kd	- L P G G P S V F P P K D V L S I X G X P -		
Clone	# 72/1	- L P G G P S V F P P K D V L S I S G R P -		
Clone	# 72/4	- L P G G P S V F P P K D V L S I S G R P -		
Clone	# 72/29	- L L G G P S V F P P K D V L S I S G R P -		
Seres humanos	$\gamma_1\gamma_3$	- L L G G P S V F P P K D T L M I S R T P -		
C112	γ_2	- V A - C P S V F L F P P K D T L M I S R T P -		
	γ_4	- F L G G P S V F L F P P K D T L M I S R T P -		
		360	370	
Camelot	γ_3 14Kd	- K G Q T R E P Q V Y T L A P X R L E L -		
Seres humanos	γ_1	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L -		
C112/C113	γ_2,γ_3	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M -		
	γ_4	- K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M -		

Quadro I
Comparação das sequências C_{H2} e C_{H3} do terminal N do camelo com as sequências deduzidas de ADNC das imunoglobulinas do camelo e com as correspondentes sequências γ dos seres humanos . (A numeracão está de acordo com as regras de Kabat *et al.* (1987) (7).

	10	20	30
G C S V Q T G G S L R L S C R I S G L T F D			# 72/4
G C S V Q T G G S L R L S C A V S G F S F S			# 72/3
G C S E Q G C G S L R L S C A I S G Y T Y G			# 72/7
G C S V Q P G G S L T L S C T V S C A T Y S			# 72/17
G C S V Q A G G S L R L S C T G S G F P Y S			# 72/18
D V Q L V A S G G S V G A G G S L R L S C T A S G D S F S			# 72/2
E V K L V E S G G G L V E P G G S L R L S C A T S G F T F S			V _{HIII} A demurganho
E V Q L L S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S			V _{HIII} do ser humano

Quadro 2

Comparação das regiões Fr 1 do terminal N da V_{HIII} do camelo com a proteína do subgrupo V_{HIII} dos seres humanos e com a proteína do subgrupo V_{HIII}A do murganho.
Os resíduos específicos do subgrupo invariável estão acientados.

	Armáçao estrutural 4										Genes J
Ser humano											
	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S
	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
Murino	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	A
	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S
Camelo											Clones de ADNc
	W	G	Q	G	T	Q	V	T	V	S	S
	W	G	Q	G	T	Q	V	T	V	S	S
	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
	W	G	R	G	T	Q	V	T	V	S	S
	W	G	Q	G	T	H	V	T	V	S	S
	W	G	Q	G	I	Q	V	T	A	S	S

Quadro 3

Comparação de alguns resíduos da armação estrutural 4 encontrados na região V_{HH} do camelo com os resíduos da armação estrutural 4 correspondentes à região de consenso dos minigenes J dos seres humanos e dos murganhos

Seres humanos e murganhos -
Camelo

amplitude 0-19 aminoácido
8-24 aminoácido
OUADRO

mais de 600 entradas
18 entradas

10	20	40
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASG CDR1 WVRQA PGKGLEWVS CDR2		
GG SVQGGGSLRL SCAISG CDR1 WFREG PGKEREGLA CDR2		
GG SVQAGGSLRL SCASSS CDR1 WYRQA PGKEREFLV CDR2		

70	80	90	110
RFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRADTAVY YCAR CDR3 WGQQTLVT VSS			
RFTIS QDSTLKTMYL LMNNLKPEDTGY YCAA CDR3 WGQQGTQVT VSS			
RFTIS QDSAKNTVYL QMNSLKPEDTAMY YCKI CDR3 WGQQGTQVT VSS			

	V _{H1} do camelo	charneira	C_{H2}
	WGQQGTQVT VSS	GTNEVCKCPKCP APELPGG PSVFVFP	
camelo	WGQQGTQVT VSS	EPKIPQPQPQPQPQP QPQPQPQP	
		KPEPECTCPKCP APELLGG PSVFIFF	

Quadro 5(1)

	C _{H1} humano	charneira	C_{H2}
γ3 humana	KVDKRV ELKTPLGDTTHTCPKCP	EPKCSDTPPPCKCP	
γ1 humana	KVDKK AEPKSCDKTHTCPPCP	APELLGG PSVFLFP	
γ2 humana	KVKVTV ERKCCVECPKCP APPVAG - PSVFLFP		
γ4 humana	KVDKRV ESKYGPCKPSCP APEFLGG PSVFLFP		

Quadro 5(2)

REFERÊNCIAS

1. Ward, E.S., Gussow, D., Griffits, A.D., Jones, P.T. e Winter, G, Nature 341, 544-546 (1989).
2. Ungar-Waron H., Eliase E., Glukman A. e Trainin Z. Isr. J. Vet. Med., 43, 198-203 (1987).
3. Bajyana Songa E. e Hamers R., Ann. Soc. Belge Med. Trop., 68, 233-240 (1988).
4. Edelman G.M., Olins D.E., Gally J.A. e Zinder N.D., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 753 (1963).
5. Franek F. e Nezlin R S., Bioldinniya, 28, 193 (1963).
6. Roitt I.M., Brostof J. e Male D.K., Immunology, Gower Med. Pub, Londres, Nova Iorque, p. 9.2. (1985).
7. Schifer M., Girling R.L., Ely K.R. e Edmundson B., Biochemistry, 12, 4620-4631 (1973).
8. Fleischman J.B., Pain R.H. e Porter R.R., Arch. Biochem. Biophys., Supl. 1, 174 (1962).
9. Roholt O., Onoue K. e Pressman D., PNAS 51, 173-178 (1964).
10. Seligmann M., Mihaesco E., Preud'homme J.L., Danon F. e Brouet J.C., Immunological Rev., 48, 145-167 (1979).
11. Henderschot L., Bole D., Köhler G. e Kearney J.F., The Journal of Cell Biology, 104, 761-767 (1987).
12. Henderschot L.M., The Journal of Cell Biology, 111, 829-837 (1990).
13. Hamers-Casterman, C., E. Wittouck, W. Van der Loo e R. Hamers, Journal of Immunogenetics, 6, 373-381 (1979).
14. Applied Biosystems - Ethanol Precipitation of Electro Eluted Electrodialysed Sample, Publicação nº 27.
15. Maniatis, T., E.F. Fritsch e J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory (1988).
16. Sastry *et al.*, PNAS, 86, 5728 (1989).
17. Sanger, F., S. Nicklen e A.R. Coulson, Proc. Nati. Acad. Sci U.S.A., 74, 5463-5467 (1977).

18. Kabat E.A., Tai Te Wu, M. Reid-Miller, H.M. Peny e K.S. Gottesman, U.S. Dpt of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health (1987).
19. Valentine, R.C. e N.M. Geen, J.M.B., 27, 615-617 (1967).

Lisboa, 15 de Março de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Região V_H derivada de uma imunoglobulina com 4 cadeias, que contém um sítio de ligação ao抗原 ou vários sítios de ligação ao抗原 e em que os resíduos de aminoácidos foram parcialmente substituídos por resíduos de aminoácidos ou por sequências específicas de uma imunoglobulina (chamada imunoglobulina de cadeia pesada) que comprehende duas cadeias polipeptídicas pesadas capazes de reconhecer e de se ligar a um ou a vários抗原s, sendo a referida imunoglobulina de cadeia pesada desprovida de cadeias leves e sendo obtêivel a partir de Camelídeos e em que na referida V_H derivada, a leucina, a prolina ou a glutamina na posição 45 da região V_H foi substituída por um resíduo de aminoácido carregado ou por um resíduo de cisteína.
2. Região V_H derivada de uma imunoglobulina com 4 cadeias, em que os resíduos de aminoácidos foram parcialmente substituídos por resíduos de aminoácidos ou por sequências específicas de uma imunoglobulina (chamada imunoglobulina de cadeia pesada) que comprehende duas cadeias polipeptídicas pesadas capazes de reconhecer e de se ligar a um ou a vários抗原s, sendo a referida imunoglobulina de cadeia pesada desprovida de cadeia leves e sendo obtêivel a partir de Camelídeos e em que na referida V_H derivada, a leucina, a prolina ou a glutamina na posição 45 da região V_H foi substituída por um resíduo de aminoácido carregado ou por um

resíduo de cisteína e que tem maior solubilidade.

3. A região V_H de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a leucina, a prolina ou a glutamina na posição 45 da região V_H foi substituída por um resíduo de arginina, ácido glutâmico ou cisteína.

4. Região V_H de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, em que a referida V_H contém ela própria um sítio de ligação ao抗原 ou vários sítios de ligação ao抗原 e que funciona na ausência de V_L .

5. Região V_H de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, em que a maior solubilidade da referida V_H é conseguida a uma concentração acima de 0,5 mg/mL, preferencialmente acima de 1 mg/mL e mais vantajosamente acima de 2 mg/mL.

6. A região V_H de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 em que uma ligação dissulfureto é estabelecida na região variável, envolvendo resíduos de aminoácidos na região CDR3.

7. A região V_H de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, na qual as ansas CDR da região estão ligadas a outras partes da região V_H por introdução de cisteínas emparelhadas, em particular na qual a ansa CDR₃ está ligada a FR₂ ou a CDR₁ e mais especialmente onde a cisteína da CDR₃ da V_H está ligada a uma cisteína na posição 31 ou 33 da CDR₁ ou na posição 45 da FR₂.

8. A região V_H de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 até 5, em que as ansas CDR estão ligadas a outras partes de uma região V por introdução de cisteínas emparelhadas.

9. Processo para a preparação de uma imunoglobulina de cadeia pesada que é desprovida de cadeias leves e do primeiro domínio (CH1) da região constante das suas cadeias polipeptídicas pesadas ou um fragmento seu, sendo o referido fragmento seleccionado a partir de um fragmento correspondente a uma cadeia polipeptídica pesada, fragmentos obtidos por digestão enzimática, especialmente aqueles obtidos por digestão parcial com papaína conduzindo ao fragmento Fc, conduzindo ao fragmento FV_{HH}h ou ao seu dímero F(V_{HH}h)2, ou a um fragmento obtido por digestão adicional com papaína do fragmento Fc, conduzindo ao fragmento pFc, fragmentos homólogos obtidos com outras enzimas proteolíticas, um fragmento com pelo menos 20 aminoácidos da região variável da imunoglobulina, ou o domínio variável completo, especialmente um fragmento correspondente aos domínios V_{HH} isolados ou aos dímeros V_{HH} ligados à articulação dissulfureto, ou um fragmento correspondente a pelo menos 10 preferencialmente 20 aminoácidos da região constante ou à região constante completa da imunoglobulina, o referido processo compreendendo os passos de:

- seleccionar imunoglobulinas tendo duas cadeias polipeptídicas pesadas e sendo desprovidas das cadeias polipeptídicas leves a partir de um animal da família dos Camelídeos e recuperar as mesmas.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9 que compreende adicionalmente o passo de preparar fragmentos das imunoglobulinas seleccionadas.

11. Processo para a preparação da região V_H de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 8, compreendendo os passos de:

- substituir resíduos de aminoácidos na região V_H derivada de uma imunoglobulina com 4 cadeias, por resíduos de aminoácidos ou sequências específicas de uma imunoglobulina (chamada de imunoglobulina de cadeia pesada) que compreende duas cadeias polipeptídicas pesadas capazes de reconhecer e de se ligar a um ou a vários抗énios, sendo a referida imunoglobulina de cadeia pesada desprovida de cadeias leves e sendo obtêvel a partir de Camelídeos,
- recuperar a referida região V_H .

12. Processo para a preparação da região V_H de acordo com a reivindicação 11, em que os resíduos de aminoácidos ou sequências específicas de uma imunoglobulina (chamada imunoglobulina de cadeia pesada) que compreende duas cadeias polipeptídicas pesadas capazes de reconhecer e de se ligar a um ou a vários抗énios, sendo a referida imunoglobulina de cadeia pesada desprovida de cadeias leves, que são inseridos na referida região V_H são fragmentos peptídicos da região V_{HH} da imunoglobulina de cadeia pesada.

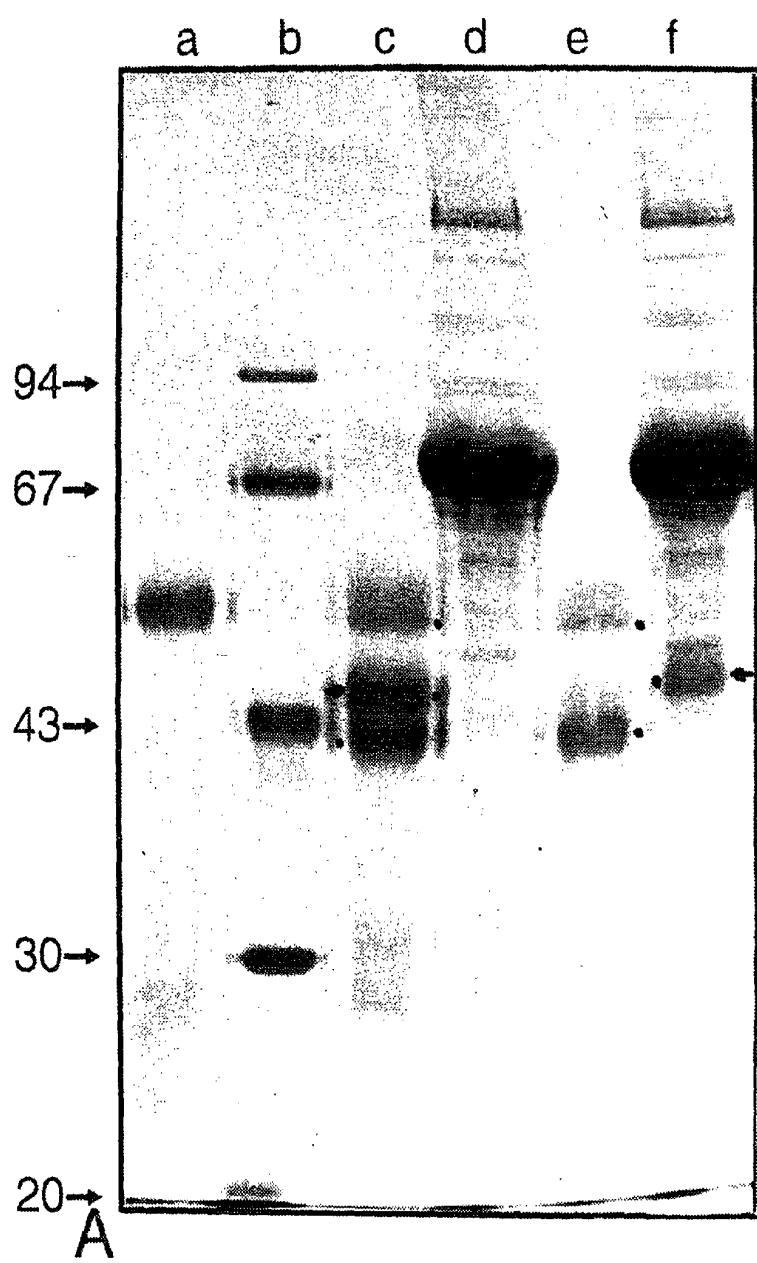


FIGURA 1A

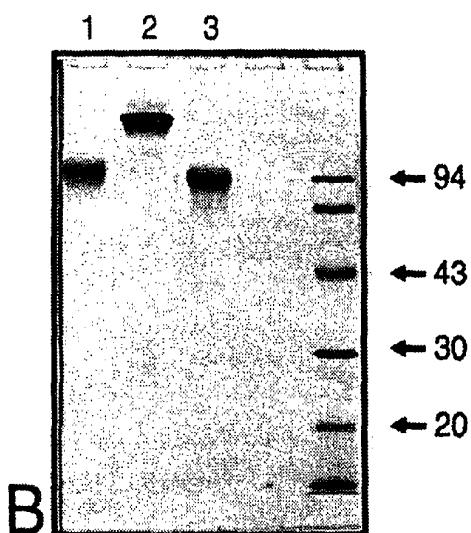


FIGURA 1B

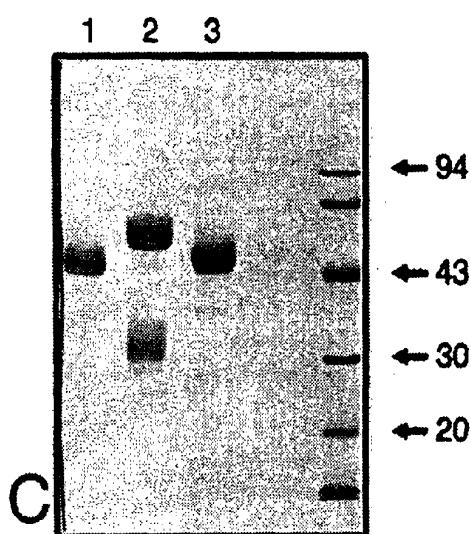


FIGURA 1C

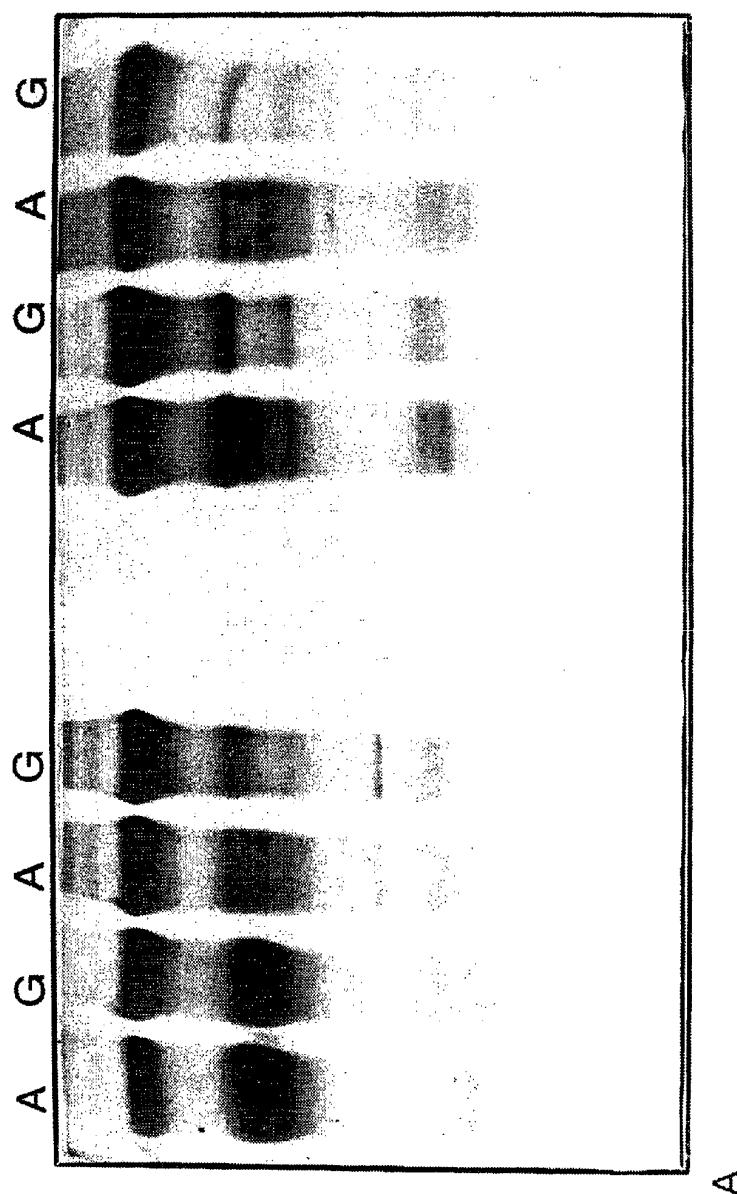


FIGURA 2A

A

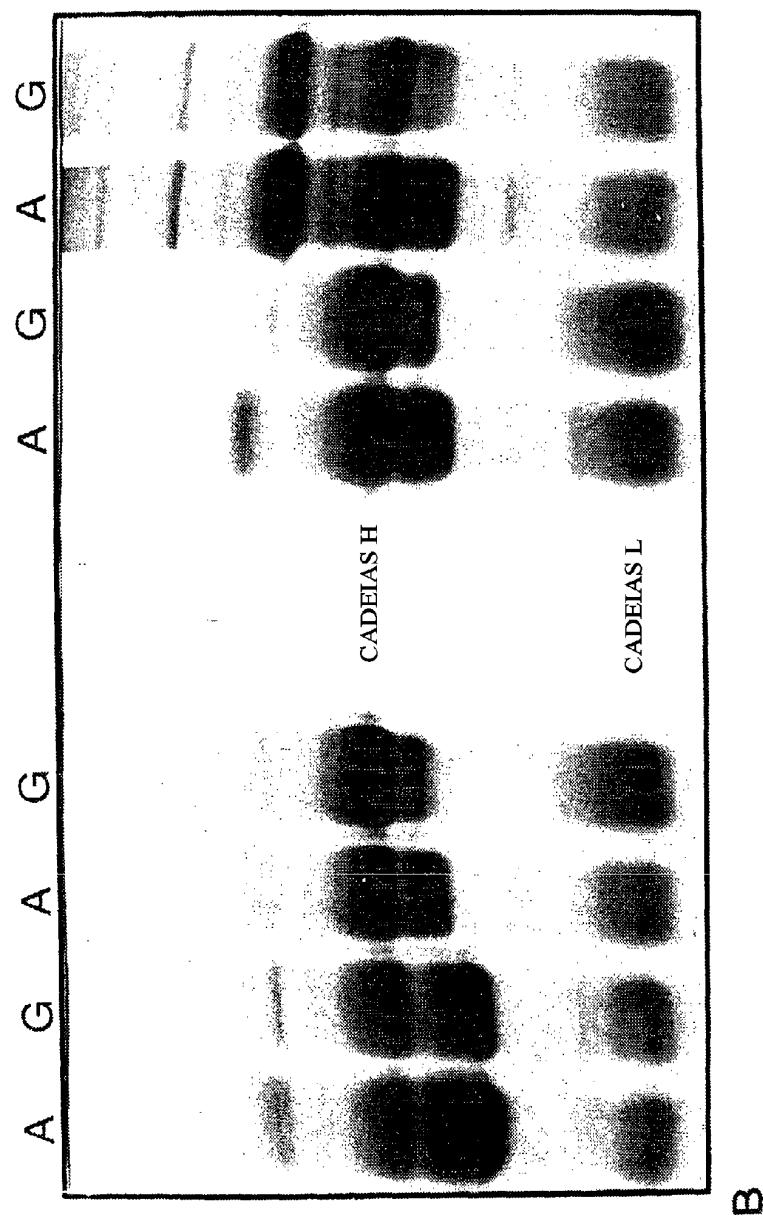
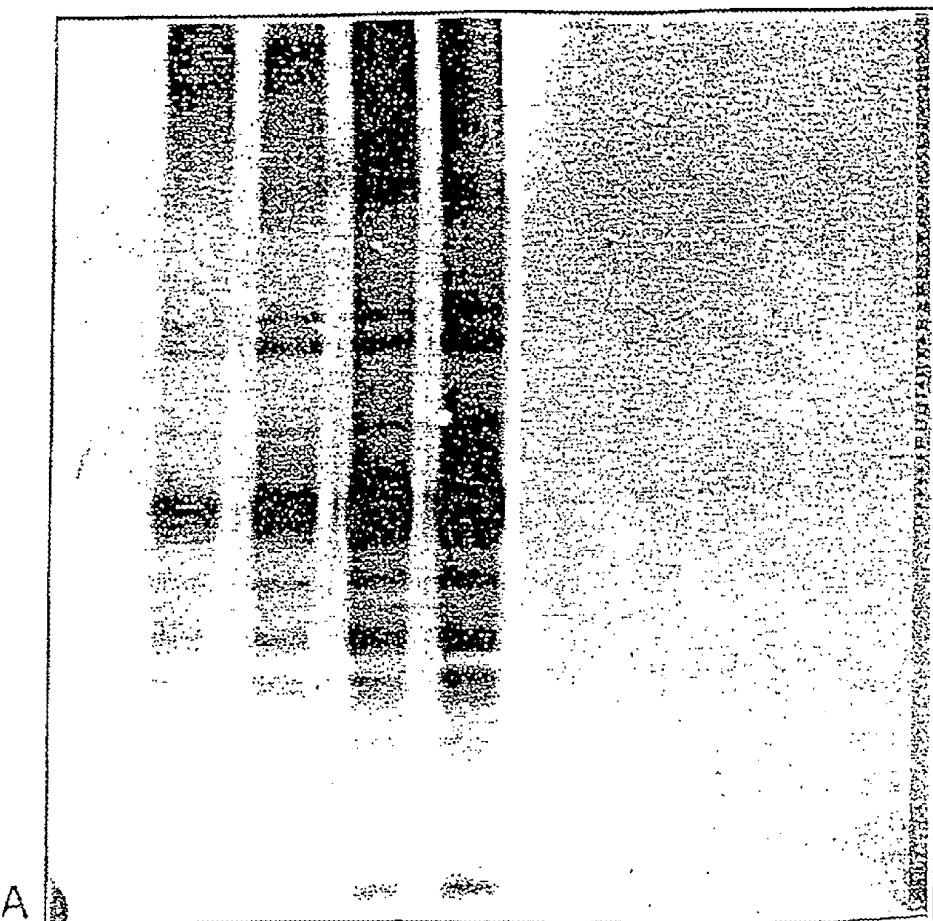


FIGURA 2B

B



Prot. A	Ig1	Ig2	Ig3	Tot.Ser.	Ig1	Ig2	Ig3	SER TOT.
CONTRAPROVA								
INFECTADAS COM T. EVANSI								
UNIDADES DE CONTAGEM/5 µL	1258	1214	2700	2978	147	157	160	107
SAUDÁVEIS								

FIGURA 3A

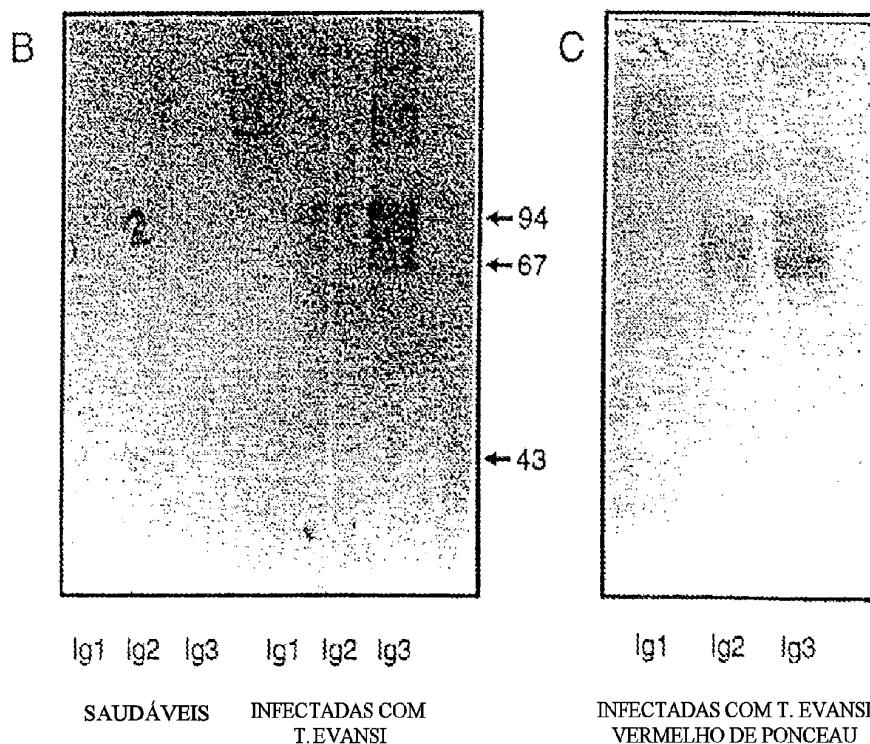


FIGURA 3B

FIGURA 3C

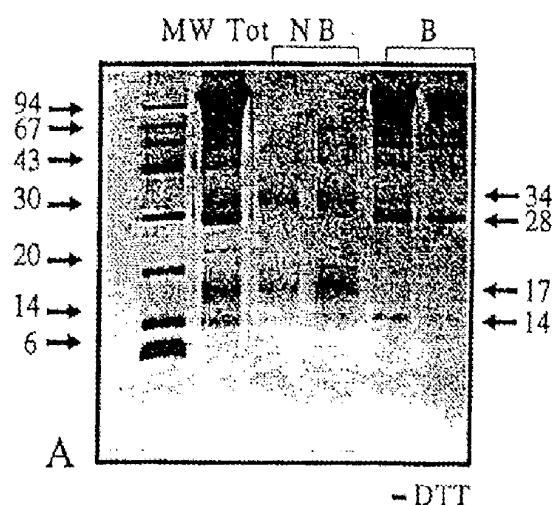


FIGURA 4A

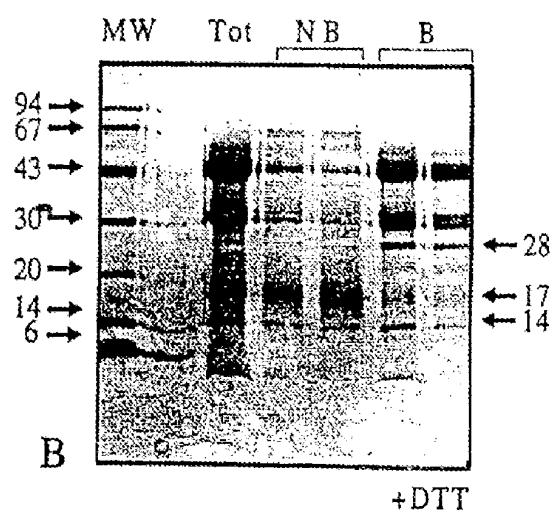


FIGURA 4B

ANÁLISE FEITA POR EGPA-DSS AOS
FRAGMENTOS DE IgG₃ OBTIDOS COM PAPAÍNA

Modello para a IgG3 do camelo

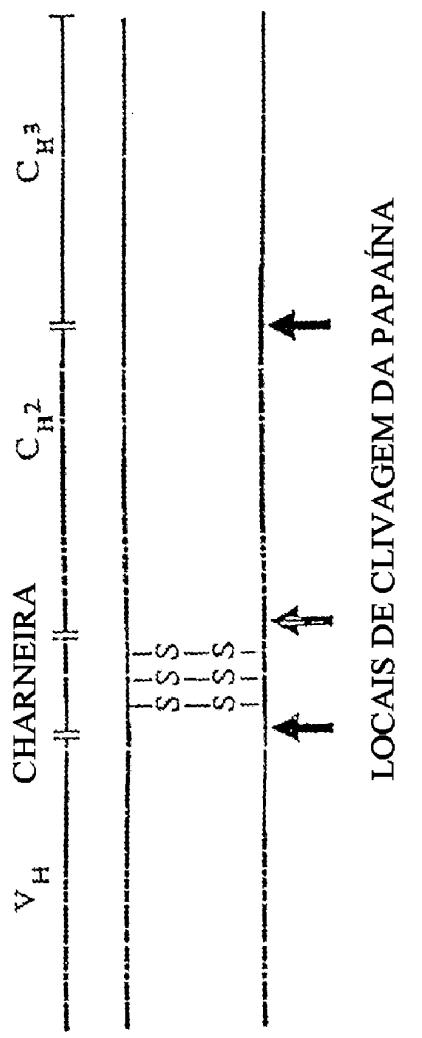


Fig. 5: Representação esquemática do modelo de IgG₃ do camelo

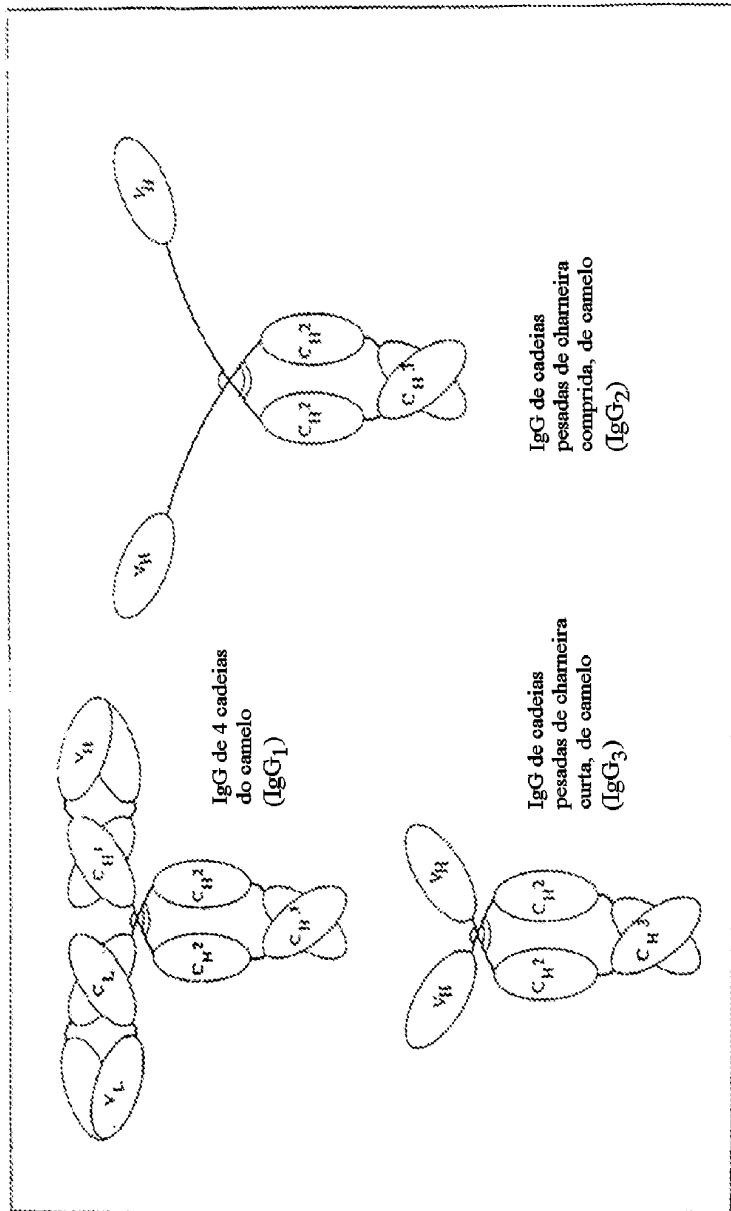


Figura 6: representação esquemática das imunoglobulinas IgG₁, IgG₂ e IgG₃ putativas. A sequência (Pro-X)₁₂ da molécula IgG putativa pode ser modelada numa repetição 6 aa

DR01006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR27006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR03006	AGGTGA-----	AACTGCTCGAG---TCTGGAGGAGG
DR11006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR24006	AGGTGA-----	AACTGCTCGAG---TCTGGGGGAGG
DR16006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR19006	C-----	TCGAG---TCTGGAGGAGG
DR07006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR16006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR20006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR25006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR20006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR21006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR09006	AGGTGA-----	AACTGCTCGAG---TCTGGGGGAGG
DR17006	C-----	TCGAG---TCTGGGGGAGG
DR13006	C-----	TCGAG---TCAAGGGGGAGG
DR02006	CTCGAGTCAGGTGTCCGGTCTGATGTGCAGCTGGTGGCGTCTGGGGGGAGG	
DR01006	ATCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTC---GTCGCG-CAGCCCTTG	
DR27006	CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCATCTTCTTCTA	
DR03006	CTCGGTGCAGACTGGAGGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGT---C-TCTG	
DR11006	GTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAAATGT---C-TCTG	
DR24006	GTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAAATGT---C-TCTG	
DR16006	CTCAGGCTGGAGGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC---CCACGG	
DR19006	CTCAGGTTCAAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC---C-TCTG	
DR07006	CTCAGGTTCAAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC---C-TCTG	
DR16006	CTCAGGTTCAAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAG---GCTCTG	
DR20006	CTCAGGTTACAGGTTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAG---CCTCTA	
DR25006	CTCAGGTTACAAAATGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTTGCG---AAATCTTG	
DR20006	CTCAGGTTCAAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTTG---TAGCTCTG	
DR21006	CTCAGGTTCAAGGTTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTGTAAAT---CTCTG	
DR09006	CTCAGGTTCAAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTGTACAG---TATACAC	
DR17006	CTCAGGTTCAACCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTGTACAGTT---TCTG	
DR13006	CTCAGGTTCAAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTGTACAG---CCTCTG	
DR02006	CTCAGGTTCAAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTGTACAG---CCTCTG	
DR01006	GA---TACAGTAATT---GTCCCCCTCACTTG-GAGCTGGTATGCCAGTT	
DR27006	AA---TATATGCCCTT---GCACCTACGACAT-GACCTGGTACCGCCAGGCT	
DR03006	GA---TTCTCCCTTA---GTACCTGGTAT-GGCCTGGTTCCGCCAGGCT	
DR11006	GC---TCTCCCAGTA---GTACTTATTGCCCT-GGGCTGGTTCCGCCAGGCT	
DR24006	GC---TCTCCCAGTA---GTACTTATTGCCCT-GGGCTGGTTCCGCCAGGCT	
DR16006	GA---TTCCGC-TCA---ATGGTTACTACAT-GCGCTGGTTCCGTCAAGGCT	
DR19006	AC---TACACCATCA---CTGATTATTGAT-GGCCTGGTTCCGCCAGGCT	
DR07006	GA---TACACGTACG---GTAGCTTCTGTAT-GGGCTGGTTCCGCCAGGCT	
DR16006	GA---TTCCCCCTATA---GTACCTCTGTCT-GGGGTGGTTCCGCCAGGCT	
DR20006	CT---CACACCGACA---GTAGCACCTGTAT-AGGCTGGTTCCGCCAGGCT	
DR25006	GA---TTGACTTTTG---ATGATTCTGACGT-GGGGTGGTACCGCCAGGCT	
DR20006	GA---TTCATTTG---AAACTTCTGAT-GGCCTGGTACCGCCAGGCT	
DR21006	GAGGTACCCCAGATCGTGTCTAAATCTTGGCCTGGTTCCGCCAGGCT	
DR09006	---CAACGATACTGGGACCA---TGGGATGGTTCCGCCAGGCT	
DR17006	---GGGCCACCTACA---GTGACTACAGTATTGGA-TGGATCCGCCAGGCT	
DR13006	G---ATACGTAT-CCT---CTATGGCCTGGTTCCGCCAGGCT	
DR02006	GAGA---CAGTTTCACTAGATT---TGCCATGTCTTGGTTCCGCCAGGCT	

FIG. 7A

DR01006	CCAGGAACGGAGCGCGAGTTCTGCTCCAGTATGGATCCGGATGGAAATAC
DR27006	CCAGGCAGGAGCGCGAATTGTCTCAAGTATAAATATTGATGGTAAGAC
DR03006	TCAGGAAAGCAGCGTGAGGGGGTCGAGGCCATTAAATAGTGGCGGTGGTAG
DR11006	CCAGGGAGGGAGCGTGAGGGGGTCACAGCGATTAA-----CACTGATGG
DR24006	CCAGGGAGGGAGCGTGAGGGGGTCACAGCGATTAA-----CACTGATGG
DR16006	CCTGGGAAGGGGCGTGAGGGGGTCGAACAATTAAATGGTGTCG-----
DR19006	CCAGGGAGGGAGCGTGAAATTGGTCGAGLGAATTCAAGTTGTCGATGTGA
DR07006	CCAGGCAGGAACGTGAGGGGATCGCAACTATTCTTAATGGTGGTACTAA
DR16006	CCAGGGAGGGAGCGTGAGGGGGTCGCGGGTTAAATAGTGCAGGAGGTAA
DR20006	CCAGGGAGGGAGCGAGGGGGTCGAAGTATATAATTGGTGGATGGTGG
DR25006	CCAGGGCATGAGTCGAAATTGGTCTCAGGTTCTGAGTGGATGGTACT-C
DR20006	CCAGGAAATGTGTGAGTTGGTCTCAGGTTCTGAGTGGATGGTACT-C
DR21006	CCAGAGAAGGAGCGCGAGGGGATCGAGTTCTTCGACTAAAGGATGGTAA
DR09006	CCAGGGAAAGAGTGCAGAAAGGGTCGCGCATATTACGCGTGGATGGTATGA
DR17006	CCAGGGAGGACGTGAAAGTAGTCGAGCGCTAAACTGGTGG-----
DR13006	CCAGGGCAGGAGCGCGAGGGGGTCGCGTTGGTCAAACGG-----
DR02006	CCAGGGAAAGGAATGCGAATTGGTCTCAAGCATTAAATGGAGGAC
DR01006	CAAGTACA-----CATACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACC
DR27006	AACATACG-----CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
DRD3006	GACATACTA-CAACACATATGCGCCGAGTCCGTGAAGGGCCGATTGCC
DR11006	CAGTATCAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCC
DR24006	CAGTGTCACT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCC
DR16006	CGA-CGTACACATACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR19006	TACT-CGC-C-TCACAGACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR07006	-----CACATACATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR16006	-----TACCTTACATGCCGACGCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR20006	-----TACGAATTATCGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR25006	CATATACAAAGAGTGGAGACTATGCTGAGTCTGTGAGGSSGCCGGGTTACC
DR20006	CA-AAACATACTACGTCGACC-GCA-----TGAAGGGCCGATTACC
DR21006	GA-----CATCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR09006	-----CCTTCATTGATGAACCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR17006	-----CGACTAGTAAATTCTACGTCGACTTTGTGAAGGGCCGATTACC
DR13006	-----CTGACAAT-AGTGCATTATATGGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR02006	-----GGCCGATTCCGTGAAGGGCCGATTACC
DR01006	ATGTCGGAGGGCAGCACCGAGTACACAGTATTCGCAAAATGGACAATCT
DR27006	ATCTCCAAGACAGCGCCAAAGAACACGGTGTATCTGCAAGATGAACAGCCT
DR03006	ATCTCCAAGACACGCCAAGGAAACGGTACATCTCCAGATGAACAAACCT
DR11006	ATCTCCAAGACACGCCAAGGAAACGGTATATCTCCAGATGAACAAACCT
DR24006	ATCTCCGAGACAGCCCCAAGAACATCGGTGTATCTGCAAGATGAACAGCCT
DR16006	ATCTCCAAGGCAACACCAAGAACACAGTGAATCTGCAAAATGAACAGCCT
DR19006	ATCTCCAAGACAGCACGTTGAAGACGATGTATCTGCAATGAACAGCCT
DR07006	ATCTCCAAGGGATGCCAAGAACATCGGTGTATCTGCAAAATGGATAACTT
DR16006	ATCTCCAAGACACGCCAAGAACACAGTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT
DR20006	ATCTCCAGAGACACGCCAAGAACATGATATAACCTTCAAAATGAACAGCCT
DR21006	ATTTCTAGAGAGAATGCCAAGAACATGATATACTACACTGAGCGGCCT
DR09006	ATCTTCTTAGATAATGACAAGACCACTTCTCTTACAACATTGATCGACT
DR17006	ATCTCCGAGACACGCCAAGAACACGTTGCTTTCGCAATGAATAGTCT
DR13006	ATTTCCAAGACACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAAATGAGCTTCT
DR02006	ATCTCCGAGACACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGCGCAACCT

FIG. 7B

DR01006	GAAACCTGAGGACACGGCGATGTATTACTGTAAAAC-A---GCCCTAC--
DR27006	GAAACCTGAGGACACGGCGATGTATTACTGTAAAAT-A---GA---TTC--
DR03006	AACCCCTGAAGACACGGCTACGTATTACTGTGCGGGCGG---TCCCAGCCC
DR11006	GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACTGCGCGGCAA---GACTGACGG
DR24006	GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACTGCGCGGCAA---GACTGACGG
DR16006	GAAACCTGAGGACACGGCCATCTACTCTGTGCGCAGCAG---G---CTC
DR19006	GACACCTGAGGACACGGCCATCTACAGTTGTGCGGCAA-C---CAG
DR07006	GAAACCTGAAGACACGGGCACCTATTACTGTGCTG-CAGTAAGT
DR16006	GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGCGCGG-CG---GATAGTCCA
DR20006	GAAACCTGAGGACACGGCCATGTACTACTGTGCAATCA---CTGAAATTG
DR25006	GAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGCGCGTAGATGGTTGGACCC
DR20006	CAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCG---CC
DR21006	GAACCCGGAGGACACTGCGACTACTACTGCGCTGCAATTCAATTAGC--
DR09006	GAGGCCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGGCAAGATTG--
DR17006	GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGTGCGCAGATTG---CGAACCC
DR13006	GCAACCTGACGACACTGGCGTGTACTACTGTGCGGCC---CAA
DR02006	GAAACCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGGGGCAGT-----
DR01006	-----A-AC---CTGGGGTTATTGTGGGTA-
DR27006	-----GTAC---CCGTGCCATCTCCCTTGATG-
DR03006	-----GGCG-CCATT-----CTTGATTTG
DR11006	AGATGGGGCTTGTGATGCGAGATGGGCGACCTTAGC-GACAAGGAC-G
DR24006	AGATGGGGCTTGTGATGCGAGATGGGCGACCTTAGC-GACAAGGAC-G
DR16006	GCGTTTTT-CTAGTCTGTGTTGGGAGCATTTC-TAGAC---TCGAAAGTAG
DR19006	TAGTTTTTACTGGTACT---GCAC---C---ACG---G
DR07006	GGTGGTAGTTGTGAATTGC---CTTTGC---TATTGACTA-----
DR16006	TGTTACATGCCGACTATGC---CCGCTCCCCCGATACTGAGACAGTTTGG
DR20006	AGTGGTATGGGTGCAATT---AAGGACTACTTTACT---C---G
DR25006	GGAAAGGAAG---GGGGAAATCGGGTTAC---CCTGGTCGGTCCAATGTGAA
DR20006	GGTTGAA---TATC---CTATTGCAAGAC-ATGTGTT
DR21006	---TGGTGGCTGGTATT---TGGACCCGAATTACTGG-CTCTCTGTG
DR09006	---GAAATACTGGA---CTTGTGGTGC---CCAGA-CTGG---AG
DR17006	AAGTATAATTATAGTATC---CTCCNNAT-----
DR13006	AAGAAGGATCGTA---CTAGATGGGC---CGAGCCT-----
DR02006	-----CTCCCTAA---TGGACCGAAATTTC
DR01006	--TGGGTANTGCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR27006	--T-----CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR03006	AAAAAGTATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR11006	TTTGCCTATAACTACTGGGGCCGGGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR24006	TTTGCCTATAACTACTGGGGCCGGGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR16006	CGA-CT-ATAACTATTGGGGCCAGGGGATCAGGTCACCGTCACTTCAC
DR19006	CGC-CTTATAACGTCGGGGTCAAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR07006	CTGGG-----GCCAGGGCACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR16006	CTGGGATGATTT---GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR20006	CTGGG-----GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR25006	GATGGTTATAACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR20006	CGAGAT---ACG---GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR21006	GGTCATATGCCATCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR09006	GATACTCGGACAG---TGGGGTCAAGGGGCCCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR17006	--TGAGTATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR13006	CGAGAAATGGACAACACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT
DR02006	CCAACATGGG--TGCCGGGGCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCCCTCACT

FIG. 7C

DR01006 AG----TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR27006 AG----TTACCCGTACGAGGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR03006 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR11006 AG----TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR24006 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR16006 ---AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR19006 ---AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR07006 ---AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR16006 ---AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR20006 ---AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR25006 ---TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR20006 ---TAGTTACCCGTACGACGAAACCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR21006 ---TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR09006 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATT
DR17006
DR13006
DR02006
-----TA

FIG. 7D

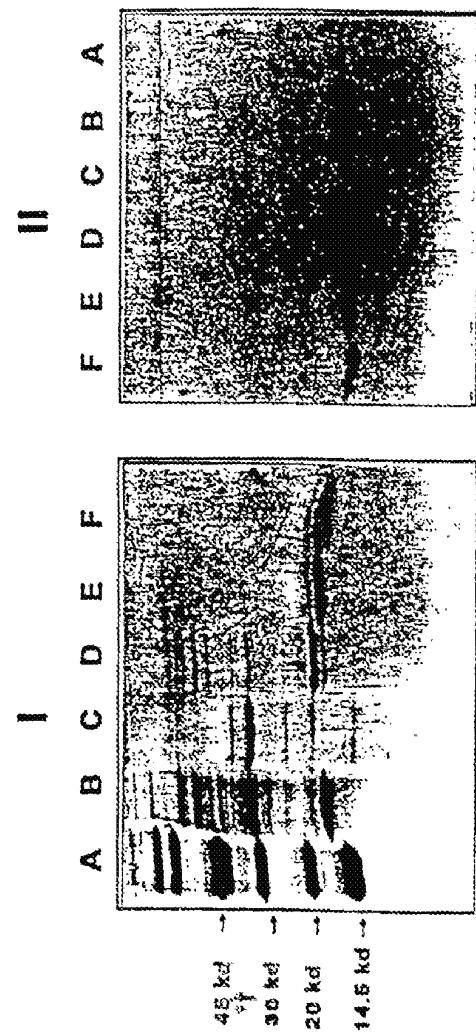


FIGURA 8A

FIGURA 8B