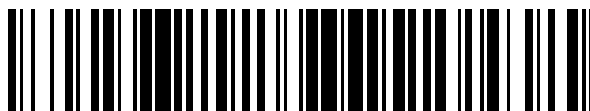


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 990**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2005 E 07075586 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1864998**

54 Título: **Moléculas de unión**

30 Prioridad:

22.07.2004 GB 0416392

10.06.2005 GB 0511881

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

31.01.2014

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (50.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GE Rotterdam, NL y
CRAIG, ROGER KINGDON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CRAIG, ROGER KINGDON;
GROSVELD, FRANKLIN GERARDUS;
JANSSENS, RICHARD WILHELM y
DRABEK, DUBRAVKA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 440 990 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la fabricación de un diverso repertorio de anticuerpos solo de cadena pesada funcionales que se someten a maduración por afinidad, y usos de los mismos. La invención también se refiere a la fabricación y uso de un diverso repertorio de anticuerpos solo de cadena pesada específicos de clase y a la fabricación y uso de complejos de polipéptido multivalentes con funcionalidad de la cadena pesada del anticuerpo, preferentemente funcionalidad de unión de la cadena pesada del anticuerpo, actividad efectora de la región constante y, opcionalmente, funciones efectoras adicionales.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de generación de anticuerpos solo de cadena pesada completamente funcionales en ratones transgénicos en respuesta a exposición a antígeno. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para la generación de anticuerpos solo de cadena pesada de alta afinidad específicos de antígeno humano de cualquier clase, o mezcla de clases, y el aislamiento y expresión de dominios de unión a antígeno de V_H completamente funcional.

La presente invención también se refiere a la generación de complejos de polipéptido multivalentes que comprenden funcionalidad de la cadena pesada, preferentemente actividad efectora de la cadena pesada y otras funciones de unión y efectoras.

También se describen anticuerpos solo de cadena pesada y otros complejos de unión multivalentes generados usando los procedimientos de la presente invención y divulgación y usos de los mismos.

Antecedentes a la invención

Los anticuerpos monoclonales o variantes de los mismos representarán una alta proporción de nuevas medicinas lanzadas en el siglo XXI. La terapia con anticuerpos monoclonales ya se ha aceptado como una vía preferida para el tratamiento de artritis reumatoide y enfermedad de Crohn y hay un impresionante progreso en el tratamiento de cáncer. Los productos basados en anticuerpos también están en desarrollo para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares e infecciosas. La mayoría de los productos de anticuerpos monoclonales comercializados reconocen y se unen a un único epítipo bien definido sobre el ligando diana (por ejemplo, TNF α). La fabricación de anticuerpos monoclonales humanos para terapia sigue dependiendo del cultivo celular de mamífero. El ensamblaje de un complejo que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (el complejo H₂L₂) y posteriores procedimientos de glucosilación postraduccionales excluye el uso de sistemas bacterianos. Los costes de producción y los costes de capital para la fabricación de anticuerpos por cultivo celular de mamífero son altos y amenazan con limitar el potencial de las terapias basadas en anticuerpos en ausencia de alternativas aceptables. Una variedad de organismos transgénicos pueden expresar anticuerpos completamente funcionales. Éstos incluyen plantas, insectos, pollos, cabras y ganado vacuno, pero ninguno se ha usado hasta ahora para fabricar productos terapéuticos comercializados.

Los fragmentos de anticuerpos funcionales pueden fabricarse en *E. coli*, pero el producto tiene generalmente baja estabilidad en suero, a menos que se PEGile durante el procedimiento de fabricación.

Los complejos de anticuerpo biespecífico son moléculas basadas en Ig manipuladas que pueden unir dos epítopos diferentes sobre tanto el mismo antígeno como sobre antígenos diferentes. Las proteínas de unión biespecíficas que incorporan anticuerpos solos o en combinación con otros ligantes son prometedoras para las modalidades de tratamiento en las que funciones inmunes humanas capturadas provocan un efecto terapéutico, por ejemplo, la eliminación de patógenos (Van Spriël y col., (1999) *J. Infect. Diseases*, 179, 661-669; Tacke y col., (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940; documento US 5.487.890), el tratamiento de cáncer (Glennie y van der Winkel, (2003) *Drug Discovery Today*, 8, 503-5100); e inmunoterapia (Van Spriël y col., (2000) *Immunol. Today*, 21, 391-397; Segal y col., (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6; Lyden y col., (2001) *Nat. Med.*, 7, 1194-1201).

Los asuntos de fabricación se agravan cuando un producto de anticuerpo biespecífico se basa en dos o más complejos de H₂L₂. Por ejemplo, la co-expresión de dos o más conjuntos de genes de la cadena pesada y ligera puede producir la formación de hasta 10 combinaciones diferentes, solo una de las cuales es el heterodímero deseado (Suresh y col., (1986) *Methods Enzymol.*, 121, 210-228).

Para tratar este asunto se han desarrollado varias estrategias para la producción en células de mamífero de formatos de IgG biespecíficas de longitud completa (BslgG) que retienen la función efectora de la cadena pesada. Las BslgG requieren cadenas pesadas de "botón y ojal" manipuladas para prevenir la formación de heterodímeros y utilizar cadenas L idénticas para prevenir el apareamiento erróneo de cadenas L (Carter, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 7-15). También se han descrito estrategias de reticulación química alternativas para la producción de complejos de fragmentos de anticuerpos que reconocen cada uno diferentes antígenos (Ferguson y col., (1995)

Arthritis and Rheumatism, 38, 190-200) o la reticulación de otras proteínas de unión, por ejemplo, colectinas, a fragmentos de anticuerpos (Tacke y col., (2004) J. Immunol., 172, 4934-4940).

El desarrollo de diacuerpos o minianticuerpos (BsAb) que generalmente carecen de funciones efectoras de la cadena pesada también supera la redundancia de heterodímeros. Éstos comprenden anticuerpos monocatenarios mínimos que incorporan sitios de unión V_H y V_L (scFv) que posteriormente se pliegan y dimerizan para formar un anticuerpo biespecífico divalente monovalente para cada uno de sus antígenos diana (Holliger y col., (1993) PNAS, 90, 6444-6448; Muller y col., (1998) FEBS Lett., 422, 259-264). En un caso, los dominios constantes C_H1 y L se han usado como dominios de heterodimerización para la formación de mini-anticuerpos bi-específicos (Muller y col., (1998) FEBS Lett., 259-264). Se ha desarrollado una variedad de procedimientos recombinantes basados en sistemas de expresión en *E. coli* para la producción de BsAb (Hudson, (1999) Curr. Opin. Immunol., 11, 548-557), aunque parecería que el coste y escala de producción del material de anticuerpo multivalente de calidad clínica sigue siendo el impedimento primario para el desarrollo clínico (Segal y col., (2001) J. Immunol. Methods, 248, 1-6).

Recientemente, el concepto de BsAb se ha extendido para englobar di-diacuerpos, anticuerpos biespecíficos tetravalentes en los que los dominios V_H y V_L en cada cadena H y L se han sustituido por pares manipulados de dominios de unión scFv. Tales construcciones, aunque son complejas de manipular, pueden ensamblarse en células de mamífero en cultivo en ausencia de redundancia de hetero-dímeros (Lu y col., (2003) J. Immunol. Methods, 279, 219-232).

La estructura de inmunoglobulinas es muy conocida en la técnica. La mayoría de las inmunoglobulinas naturales comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces disulfuro entre dominios bisagra localizados aproximadamente a mitad de camino a lo largo de cada cadena pesada. Una cadena ligera está asociada a cada cadena pesada en el lado del extremo N del dominio bisagra. Cada cadena ligera está normalmente unida a su cadena pesada respectiva por un enlace disulfuro próximo al dominio bisagra.

Cuando una molécula de Ig está correctamente plegada, cada cadena se pliega en varios dominios globulares distintos unidos por una secuencia de polipéptidos más lineal. Por ejemplo, la cadena ligera se pliega en un dominio variable (V_L) y uno constante (C_L). Las cadenas pesadas tienen un único dominio variable V_H , adyacente al dominio variable de la cadena ligera, un primer dominio constante, un dominio bisagra y dos o tres dominios constantes adicionales. La interacción de los dominios variables de la cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) produce la formación de una región de unión a antígeno (Fv). Generalmente, se requieren tanto V_H como V_L para la unión a antígeno, aunque se ha mostrado que dímeros de cadenas pesadas y fragmentos del extremo amino retienen actividad en ausencia de cadena ligera (Jaton y col., (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195).

Con la aparición de nuevas técnicas de biología molecular, la presencia de anticuerpo solo de cadena pesada (que carece de cadena ligera) se identificó en trastornos proliferativos de linfocitos B en el hombre (enfermedad de la cadena pesada) y en sistemas de modelo murino. El análisis de la enfermedad de la cadena pesada al nivel molecular mostró que las mutaciones y deleciones al nivel del genoma podrían producir expresión inapropiada del dominio C_H1 de la cadena pesada, dando lugar a la expresión de anticuerpo solo de cadena pesada que carece de la capacidad para unir cadena ligera (véanse Hendershot y col., (1987) J. Cell Biol., 104, 761-767; Brandt y col., (1984) Mol. Cell. Biol., 4, 1270-1277).

Estudios separados sobre dominios V_H humanos aislados derivados de bibliotecas de fagos demostraron unión específica a antígeno de dominios V_H , pero estos dominios V_H demostraron ser de baja solubilidad. Además, se sugirió que la selección de dominios V_H humanos con características de unión específica expresados sobre matrices de fago podrían formar los bloques constitutivos para anticuerpos manipulados (Ward y col., (1989) Nature, 341, 544-546).

Estudios usando otras especies de vertebrados han mostrado que los camélidos, como resultado de mutaciones de genes naturales, producen dímeros de solo cadena pesada de IgG2 y IgG3 funcionales que no pueden unirse a cadena ligera debido a la ausencia de la región de unión a cadena ligera C_H1 (Hamers-Casterman y col., (1993) Nature, 363, 446-448) y que especies tales como tiburón producen una familia de proteína de unión similar a solo cadena pesada, probablemente relacionada con el receptor de linfocitos T de mamífero o cadena ligera de la inmunoglobulina (Stanfield y col., (2004) Science, 305, 1770-1773).

Un rasgo caracterizador del anticuerpo solo de cadena pesada de camélido es el dominio V_H de camélido, que proporciona solubilidad mejorada con respecto al dominio V_H humano. V_H humano puede manipularse para características de solubilidad mejoradas (véanse Davies y Riechmann, (1996) Protein Eng., 9 (6), 531-537; Lutz y Muldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38) o la solubilidad puede adquirirse por selección natural *in vivo* (véase Tanha y col., (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780). Sin embargo, si los dominios de unión V_H se han derivado de bibliotecas de fagos, afinidades intrínsecas por antígeno siguen en el intervalo de micromolar bajo a nanomolar alto, a pesar de la aplicación de estrategias de mejora de la afinidad que implican, por ejemplo, aleatorización de puntos calientes de afinidad (Yau y col., (2005) J. Immunol. Methods, 297, 213-224).

Los anticuerpos V_H de camélido también se caracterizan por un bucle de CDR3 modificado. Este bucle de CDR3 es, en promedio, más largo que aquellos encontrados en anticuerpos de no camélido y es una característica que se considera que es de gran influencia sobre la afinidad y especificidad por antígeno global, que compensa la ausencia de un dominio V_L en especies de anticuerpos solo de cadena pesada de camélido (Desmyter y col., (1996) Nat. Struct. Biol., 3, 803-811, Riechmann y Muildermans, (1999) J. Immunol. Methods, 23, 25-28).

Recientes estudios estructurales sobre anticuerpo de camélido sugieren que la diversidad de anticuerpos está accionada en gran parte por procesos de maduración *in vivo* con dependencia de eventos de recombinación de V(D)J y mutación somática (De Genst y col., (2005) J. Biol. Chem., 280 (14), 14114-14121).

Recientemente se han desarrollado procedimientos para la producción de anticuerpos solo de cadena pesada en mamíferos transgénicos (véanse los documentos WO02/085945 y WO02/085944). El anticuerpo solo de cadena pesada funcional de posiblemente cualquier clase (IgM, IgG, IgD, IgA o IgE) y derivado de cualquier mamífero (incluyendo ser humano) puede producirse a partir de mamíferos transgénicos (preferentemente ratones) como resultado de exposición a antígeno.

El sitio de la cadena pesada de la inmunoglobulina normal comprende una pluralidad de segmentos del gen V, varios segmentos del gen D y varios segmentos del gen J. Cada segmento del gen V codifica del extremo N casi al extremo C de un dominio V. El extremo C de cada dominio V está codificado por un segmento del gen D y un segmento del gen J. La transposición VDJ en linfocitos B, seguido de maduración por afinidad, proporciona dominios de unión V_H que luego, con dominios de unión V_L , forman un sitio de reconocimiento o de unión a antígeno. La interacción de las cadenas pesadas y ligeras se facilita por la región C_H1 de la cadena pesada y la región κ o λ de la cadena ligera.

Para la producción de anticuerpo solo de cadena pesada, el sitio de la cadena pesada en la línea germinal comprende segmentos de genes que codifican algunas o todas las posibles regiones constantes. Durante la maduración, un dominio de unión V_H reorganizado se corta y empalma sobre el segmento que codifica la región constante C_H2 , para proporcionar un gen reorganizado que codifica una cadena pesada que carece de un dominio C_H1 y, por tanto, no puede asociarse con una cadena ligera de la inmunoglobulina.

Los anticuerpos monoclonales de solo cadena pesada pueden recuperarse de linfocitos B del bazo por tecnología de clonación convencional o recuperarse de ARNm de linfocitos B por tecnología de expresión en fago (Ward y col., (1989) Nature, 341, 544-546). Los anticuerpos solo de cadena pesada derivados de camélidos o animales transgénicos son de alta afinidad. El análisis de secuencias de tetrámeros de H_2L_2 normales demuestra que la diversidad resulta principalmente de una combinación de transposición VDJ e hipermutación somática (Xu y Davies, (2000) Immunity, 13, 37-45). El análisis de secuencias de ARNm de solo cadena pesada expresada, tanto si se produce en camélidos como en animales transgénicos, soporta esta observación (De Genst y col., (2005) J. Biol. Chem., 280, 14114-14121).

Un rasgo importante y común de regiones V_H de camélido y humanas naturales es que cada región se une como un monómero sin dependencia de la dimerización con una región V_L para solubilidad y afinidad de unión óptimas. Estos rasgos se han reconocido previamente como particularmente adecuados para la producción de agentes de bloqueo y agentes de penetración de tejidos.

También pueden generarse homo- o hetero-dímeros por escisión enzimática de anticuerpos solo de cadena pesada o por rutas de síntesis (Jaton y col., (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195 y el documento US2003/0058074 A1). Sin embargo, los beneficios de un dominio de unión de anticuerpo monomérico tienen que usarse ya para aventajar en el diseño de proteínas multímeras como reactivos, terapéuticos y diagnósticos.

V_H humano o V_{HH} de camélido producidos por tecnología de expresión en fago carecen de la ventaja de características mejoradas como resultado de mutaciones somáticas y la diversidad adicional proporcionada por la recombinación de la región D y J en la región CDR3 del sitio de unión a anticuerpo normal (Xu y Davies, (2000) Immunity, 13, 37-45). V_{HH} de camélido, aunque muestra beneficios en la solubilidad con respecto a V_H humana, es antigénica en el hombre y debe generarse por inmunización de camélidos o por tecnología de expresión en fago.

La incorporación de dominios de unión V_H tiene la clara ventaja con respecto al uso de scFv que debe manipularse a partir de dominios V_H y V_L con el potencial asociado de pérdida de especificidad y avidéz. Los dominios de unión V_H derivados de familias de genes relacionadas tales como receptores de linfocitos T o la familia de inmunoglobulinas de tiburón también proporciona alternativas a scFv para la generación de moléculas específicas de bi- o multi-unión. También pueden usarse otras proteínas de unión que se producen naturalmente y dominios de las mismas que incluyen, por ejemplo, fragmentos de receptor soluble.

Las clases de anticuerpos se diferencian en su función fisiológica. Por ejemplo, la IgG desempeña una función dominante en una respuesta inmunitaria madura. La IgM participa en la fijación y aglutinación de complemento. La IgA es la principal clase de Ig en secreciones - lágrimas, saliva, calostro, moco - y así desempeña una función en inmunidad local. La inclusión de regiones constantes de la cadena pesada específicas de clase cuando se

manipulan complejos de unión multivalentes proporciona los beneficios terapéuticos de función efectora *in vivo* dependiente de la funcionalidad requerida. La manipulación de regiones efectoras individuales también puede producir la adición o delección de funcionalidad (Van Dijk y van der Winkel, Curr. Opin. Chem. Biol., (2001) Aug 5 (4), 368-374). Parece probable que la producción y selección óptima de anticuerpos solo de cadena pesada que comprenden dominios de unión V_H de alta afinidad (tanto si son de origen humano como de camélido o cualquier origen) se beneficiarán de enfoques alternativos a aquellos dependientes de la selección de bibliotecas de fagos al azar que no facilitan la recombinación *in vivo* y maduración por afinidad.

Así, la inclusión de funcionalidad de la región constante de IgA proporcionaría función mucosa mejorada contra patógenos (Leher y col., (1999) Exp. Eye. Res., 69, 75-84), mientras que la presencia de funcionalidad de la región constante de IgG1 proporciona estabilidad en suero potenciada *in vivo*. La presencia de dominios constantes C_{H2} y C_{H3} de la cadena pesada proporciona la base para dimerización estable como se observa en anticuerpos naturales, y proporciona sitios de reconocimiento para la glucosilación postraducciona. La presencia de C_{H2} y C_{H3} también permite el reconocimiento de anticuerpos secundarios cuando se usan complejos biespecíficos y multivalentes como reactivos y diagnósticos.

Previamente se han clonado secuencias de la región variable de solo cadena pesada de camélido previamente reorganizadas aisladas enfrente de una región bisagra y dominio efector de IgG1 humana, insertado en vectores y expresado en células COS para generar anticuerpo. Los anticuerpos expresados en este entorno *in vitro* ya se han sometido a los procesos de cambio de clase (isotipo) y maduración por afinidad (hipermutación) *in vivo* en el camello y pueden unirse a antígeno (Riechmann y Muildermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38).

Sigue existiendo la necesidad en la materia de maximizar la diversidad de anticuerpos solo de cadena pesada y respuesta de linfocitos B *in vivo* y, en particular, generar un repertorio funcional de anticuerpos solo de cadena pesada humanos específicos de clase y dominios de unión de solo cadena pesada V_H funcionales que retengan las máximas posibilidades de unión a antígeno para uso en diversas aplicaciones clínicas, industriales y de investigación.

También sigue existiendo una necesidad en la materia de producir un complejo de unión a polipéptido soluble, bi-valente o multi-valente que comprenda al menos parte de una cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación con un cadena efectora (ligera), que es fisiológicamente estable y tiene función efectora.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un complejo de polipéptido de unión que consiste en un dímero de una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada en el que: cada cadena pesada comprende dos dominios de unión V_H ligados por un dominio de dimerización; y cada dominio de dimerización comprende al menos dominios constantes de anticuerpos de cadena CH_2 , CH_3 y opcionalmente CH_4 de cualquier clase de gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

La invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica ambas cadenas pesadas de un complejo de unión de polipéptido como se ha descrito anteriormente.

La invención también proporciona un vector de clonación o de expresión que contiene un polinucleótido aislado como se ha descrito anteriormente.

La invención también proporciona una célula huésped transformada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente.

La invención también proporciona un procedimiento para la producción de un complejo de polipéptido de unión como se ha descrito anteriormente que comprende cultivar la célula huésped como se ha descrito anteriormente y aislar el complejo de polipéptido de unión.

La invención también proporciona una composición que comprende el complejo de polipéptido de unión de una cualquiera de las reivindicaciones como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacológicamente apropiado. La invención también proporciona un complejo de polipéptido de unión como se ha descrito anteriormente o la composición como se ha descrito anteriormente, para su uso en terapia.

La invención también proporciona un complejo de polipéptido de unión como se ha descrito anteriormente, para su uso en diagnosticar una enfermedad.

En el presente documento se desvela un procedimiento para la producción de un anticuerpo solo de cadena pesada V_H o a solo de cadena pesada V_H de camélido (V_{HH}) en un mamífero transgénico que comprende la etapa de expresar un sitio de la cadena pesada V_H heterólogo o V_H de camélido (V_{HH}) en ese mamífero, en el que el sitio de la cadena pesada V_H o V_H de camélido (V_{HH}) comprende una región constante de la cadena pesada que no codifica un dominio C_{H1} y cuyo sitio, cuando se expresa, puede formar anticuerpos solo de cadena pesada de clase o clases

definidas.

El sitio de la cadena pesada V_H o V_H de camélido (V_{HH}) puede comprender uno o más segmentos del gen V de camélido o no de camélido. Preferentemente, el segmento del gen V se ha seleccionado o manipulado para mostrar características de solubilidad mejoradas. Preferentemente, el segmento del gen V se deriva de un ser humano.

La región constante de la cadena pesada del sitio de la cadena pesada puede comprender un gen de la región constante de la cadena pesada $C\alpha_1$ y/o $C\alpha_2$, $C\epsilon$, $C\delta$, $C\gamma$ y/o $C\mu$. Además, la región constante de la cadena pesada del sitio de la cadena pesada puede comprender más de una de las siguientes regiones constantes de la cadena pesada: $C\alpha_1$, $C\alpha_2$, $C\epsilon$, $C\delta$, $C\gamma$ $C\mu$.

Preferentemente, el sitio de la cadena pesada V_H comprende una región variable que comprende al menos un segmento del gen V humano o de camélido, al menos un segmento D y al menos un segmento J en el que un segmento del gen V humano o de camélido, un segmento del gen D y un segmento del gen J pueden recombinarse para formar una secuencia codificante VDJ. El sitio de la cadena pesada comprende preferentemente veinte o más segmentos del gen D y/o cinco o más segmentos del gen J. Preferentemente, los segmentos D y J son de origen vertebrado, preferentemente humano. El bucle CDR3 puede derivarse usando segmentos del gen D y J derivados de cualquier vertebrado y son preferentemente segmentos del gen D y J humanos.

El sitio de la cadena pesada V_H también puede comprender una secuencia de recombinación (rss) que puede recombinar un segmento del gen J directamente con un gen de la región constante de la cadena pesada.

La región constante de la cadena pesada del sitio de la cadena pesada heterólogo es de origen humano u origen vertebrado, por ejemplo, de origen de camélido. Alternativamente, la región constante puede no ser de origen de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

Preferentemente, los procedimientos desvelados en el presente documento producen esencialmente maduración de linfocitos B normales. En el presente documento también se desvela un anticuerpo solo de cadena pesada, o un fragmento del mismo, o una mezcla de clases de anticuerpos solo de cadena pesada obtenidos u obtenibles según un procedimiento desvelado en el presente documento. Este anticuerpo solo de cadena pesada puede ser un anticuerpo monoclonal, o fragmento del mismo, tal como un dominio de unión V_H humano o de camélido. El dominio de unión V_H desvelado en el presente documento puede carecer de un bucle de CDR3 similar a camélido extendido o, alternativamente, puede comprender un bucle de CDR3 similar a camélido extendido.

En el presente documento también se desvela un vector que comprende un sitio de la cadena pesada heterólogo como se desvela en el presente documento y una célula huésped transformada con un vector tal.

En el presente documento también se desvela un mamífero transgénico que expresa un sitio de la cadena pesada heterólogo descrito en el presente documento. Preferentemente, el mamífero transgénico de la divulgación tiene una capacidad reducida para producir anticuerpos que incluyen cadenas ligeras.

También se desvela el uso de un anticuerpo solo de cadena pesada, o fragmento del mismo, según la divulgación, en la preparación de un medicamento para inmunoterapia. Los anticuerpos solo de cadena pesada de la divulgación también pueden usarse como diagnósticos, reactivos, abzymas o agentes inhibidores. También se desvela una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo solo de cadena pesada o fragmento del mismo según la divulgación, y un vehículo farmacológicamente apropiado.

En el presente documento también se desvela un procedimiento de producción y selección de anticuerpos solo de cadena pesada que comprende las etapas de:

- a) inyectar un antígeno en el mamífero transgénico como se describe en el presente documento;
- b) aislar una célula o tejido que expresa un anticuerpo solo de cadena pesada específico de antígeno de interés; y
- c) producir un hibridoma a partir de la célula o tejido de la etapa (b) y
- d) opcionalmente clonar el ARNm del anticuerpo solo de cadena pesada de dicho hibridoma para la posterior producción en un sistema de expresión heterólogo tal como un sistema de mamífero, planta, insecto, microbiano, fúngico o alternativo.

Los dominios de unión V_H pueden entonces producirse identificando y aislando un dominio V_H específico de antígeno del ARNm clonado de la etapa c).

Los dominios de unión V_H de la divulgación también pueden producirse:

- a) inyectando un antígeno en el mamífero transgénico descrito en el presente documento;
- b) aislando una célula o tejido que expresa un anticuerpo solo de cadena pesada específico de antígeno de interés;

- c) clonando el sitio V_H de ARNm derivado de la célula aislada o tejido;
 d) expresando la proteína codificada usando un fago o biblioteca similar;
 e) identificando el (los) dominio(s) V_H específico(s) de antígeno; y
 f) expresando el (los) dominio(s) V_H solo(s) o como una proteína de fusión en sistemas de expresión bacterianos, de levadura o alternativos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los presentes inventores han vencido las limitaciones de la técnica anterior y mostrado que pueden generarse animales transgénicos, en particular ratones, usando "micrositios" para producir anticuerpos solo de cadena pesada específicos de clase o una mezcla de diferentes clases de anticuerpos solo de cadena pesada que son secretados por plasma o linfocitos B. Éstos pueden entonces usarse bien para generar un suministro fidedigno de anticuerpo solo de cadena pesada específico de clase usando tecnología de hibridomas establecida o como fuente de dominios de unión V_H de camélido (V_{HH}) funcionales o dominios de unión V_H solo de cadena pesada, preferentemente dominios de unión V_H solo de cadena pesada solubles de origen humano, que están libres de funciones efectoras pero que retienen función de unión.

Los anticuerpos solo de cadena pesada (incluyendo anticuerpos de camélido) que pueden generarse mediante los procedimientos desvelados en el presente documento muestran alta afinidad de unión, resultante de transposiciones y mutaciones somáticas de segmentos de los genes V, D y J, generalmente en ausencia de un bucle CDR3 alargado. Se observa maduración de linfocitos B normales esencialmente con altos niveles de anticuerpo solo de cadena pesada presente en plasma aislado (a condición de que el dominio C_{H1} se haya eliminado de todas las clases de anticuerpos presentes en el sitio recombinante). La maduración de linfocitos B y la secreción de dímeros (por ejemplo, IgG) o multímeros (por ejemplo, IgM) ensamblados no depende de la presencia o expresión de genes de la cadena ligera.

El análisis de secuencias de nucleótidos de ARNm específico de antígeno que codifica una cadena pesada específica de antígeno aislada de hibridomas derivados de ratones transgénicos ha demostrado que la diversidad de anticuerpos de la cadena pesada es principalmente una función de la recombinación VDJ. Además, los presentes inventores han mostrado que la diversidad de anticuerpos se genera en la región CDR3 del dominio de unión a antígeno funcional del anticuerpo solo de cadena pesada con una contribución más limitada de mutaciones somáticas en los dominios V_H. Usando los procedimientos descritos en el presente documento, los dominios V_H funcionales pueden clonarse y expresarse en sistemas bacterianos para generar dominios de unión V_H con retención completa de la unión a antígeno, especificidad y afinidad. Además, los dímeros y multímeros de la cadena pesada específicos de clase pueden secretarse por líneas celulares de hibridoma en cultivo.

La invención también enseña que ratones transgénicos pueden programarse para producir clases preferidas de anticuerpo solo de cadena pesada en respuesta a exposición a antígeno, por ejemplo, solo IgG a diferencia de solo IgM o, por ejemplo, mezclas de IgA, IgG y IgM.

Los inventores han descrito previamente (véanse los documentos WO02/085945 y WO02/085944) la generación de ratones transgénicos que expresan una región constante de IgG humana mínima del sitio de la cadena pesada que carece del exón C_{H1} y ligada por segmentos D y J humanos con dos genes V_{HH} de llama. Esto produce anticuerpo solo de cadena pesada IgG funcional, de alta afinidad, específico de antígeno cuando se expone a antígeno. Pueden obtenerse mezclas de clases de anticuerpos solo de cadena pesada (IgM e IgG) por cambio de clase *in vivo* mediante la utilización de construcciones de genes que incorporan regiones constantes de la cadena pesada en tándem (a condición de que todos los genes de la región constante carezcan de un dominio C_{H1} y, cuando esté presente, un dominio C_{H4}).

Las mejoras descritas en el presente documento muestran que un ratón construido con el mismo sitio de la región constante de IgG ligado por segmentos de D y J humanos con dos genes V_{HH} de llama y un sitio de la región constante de IgM humana que carece de un exón C_{H1} ligado por los mismos segmentos de genes D y J humanos con dos genes V_{HH} de llama también produce anticuerpo solo de cadena pesada IgM de alto peso molecular (multimérico) y anticuerpo solo de cadena pesada IgG (dímero). Sorprendentemente, la maduración de linfocitos B normales y la producción de anticuerpos depende esencialmente de la ausencia completa de secuencias de C_{H1} de cada región constante de la cadena pesada presente en el sitio transgénico. Además, no hay requisito para la eliminación del exón C_{H4} si está presente.

Así, por ejemplo, un animal transgénico que lleva un sitio de la cadena pesada de IgM humana con un exón C_{H1} funcional ligado por los mismos segmentos de genes D y J humanos a dos segmentos del gen V de llama, y región constante de IgG del sitio de la cadena pesada que carece del exón C_{H1} ligado por los mismos segmentos de genes D y J humanos a dos segmentos del gen V de llama, produce niveles muy bajos de anticuerpo solo de cadena pesada y no muestra pruebas de maduración de linfocitos B.

Otros dominios efectoras, que incluyen el dominio C_{H4}, pueden incorporarse o no, según se desee, para introducir en, o eliminar de, el anticuerpo solo de cadena pesada resultante, rasgos efectoras.

Los inventores han encontrado que la expresión productiva de anticuerpo (es decir, maduración de linfocitos B) puede resultar del uso de cualquier segmento del gen V presente en la construcción. El aislamiento y la secuenciación de ARNm de anticuerpo derivado de linfocitos B muestran que la recombinación de segmentos de los genes D y J se produce para generar diversidad de CDR3. La comparación de secuencias de dominios V_H resultantes revela mutaciones somáticas, que indica que los eventos de maduración por afinidad se han producido en los segmentos de los genes D y J recombinados y también en el dominio V_H del ARNm de anticuerpo expresado resultante.

Construcciones preferidas incorporan segmentos del gen V seleccionado o manipulado para solubilidad mejorada y ligados a una agrupación de cadenas de D y J para la recombinación y generación de CDR3. Preferentemente, las secuencias de VDJ están ligadas a dominio(s) efector(es) constante(s) de elección en tándem, cada uno carente de un exón C_H1.

La invención no se limita a la derivación y producción de anticuerpo solo de cadena pesada específico de clase humana o de camélido o dominios de unión V_H humanos (preferentemente dominios de unión V_H solubles) (solos o ligados al dominio efector de elección), sino que engloba la producción de combinaciones químicas de cualquier segmento del gen V de origen vertebrado (opcionalmente manipulado para mejorar las características de solubilidad) ligado a segmentos de los genes D y J. Preferentemente, los segmentos del gen V son de origen humano y no son segmentos del gen V derivados de un camélido. Los dominios V_H resultantes pueden no comprender un bucle CDR3 similar a camélido alargado, a menos que los segmentos D y J se hayan derivado de un camélido. Esto produce un dominio V_H que presenta diversidad de CDR3 y maduración por afinidad operacionalmente ligada a una región constante efectora. Esto último garantiza secreción funcional y opcionalmente ensamblaje en el vertebrado transgénico parental de elección y también proporciona la posterior función efectora de selección en caso de que esta sea requerida.

Estas observaciones tienen importantes implicaciones para la manipulación mejorada y simplificada de anticuerpos solo de cadena pesada específicos de clase y la derivación de dominios V_H solubles de alta afinidad que incorporan maduración por afinidad mediante mutación somática. La incorporación de funciones efectoras de la región constante de la cadena pesada seleccionada (que carece de C_H1) o mezclas de las mismas permite la producción de cualquier clase de anticuerpos solo de cadena pesada o cualquier mezcla de anticuerpos solo de cadena pesada sin el requisito de ingeniería de anticuerpos adicional. Los dominios V_H pueden expresarse solos en sistemas de micro-organismos bacterianos u otros o en anticuerpo solo de cadena pesada funcional que incorpora dominios efectores secretados por hibridomas o células transfectadas en cultivo. Los anticuerpos y dominios de unión V_H de origen humano tienen aplicaciones muy amplias en el campo de la asistencia sanitaria como medicinas, diagnósticos y reactivos, con aplicaciones agrícolas, medioambientales e industriales paralelas.

Así, en un primer aspecto, en el presente documento se desvela un procedimiento para la producción de un anticuerpo solo de cadena pesada V_H en un mamífero transgénico que comprende la etapa de expresar un sitio de la cadena pesada heterólogo V_H en ese mamífero. Preferentemente, el sitio de la cadena pesada V_H comprende una región constante de la cadena pesada que no codifica un dominio C_H1 y cuyo sitio puede formar un diverso repertorio de anticuerpos solo de cadena pesada completos cuando se expresa.

El primer aspecto de la presente divulgación también proporciona un procedimiento para la producción de un anticuerpo solo de cadena pesada V_H de camélido en un mamífero transgénico que comprende la etapa de expresar un sitio de la cadena pesada V_H de camélido en ese mamífero, en el que el sitio de la cadena pesada V_H comprende una región constante de la cadena pesada que no codifica un dominio C_H1 y cuyo sitio, cuando se expresa, puede formar un diverso repertorio de anticuerpos solo de cadena pesada completos que incorpora transposición VDJ y maduración por afinidad en respuesta a exposición a antígeno.

Las moléculas efectoras de la cadena pesada pueden manipularse para estar libres de dominios funcionales, por ejemplo, los dominios C_H4 del extremo carboxi, a condición de que la manipulación no afecte mecanismos secretores que prevengan el ensamblaje de la superficie celular y, por consiguiente, la maduración de linfocitos B. Los exones C_H1 solos se delecionan del sitio heterólogo o están ausentes del sitio. Características adicionales pueden manipularse en el sitio, por ejemplo, para mejorar la glucosilación, o añadir función.

Preferentemente, el sitio heterólogo, cuando se expresa, puede formar moléculas de IgA, IgE, IgG, IgD o IgM funcionales o isotipos de las mismas. También pueden producirse clases de anticuerpos individuales o mezclas de clases de anticuerpos o isotipos de los mismos.

Por consiguiente, el sitio de la cadena pesada heterólogo se diseña para producir clases preferidas o mezclas de anticuerpo solo de cadena pesada dependiendo del (de las) clase(s) de anticuerpo requerida(s), con esencialmente maduración de linfocitos B normales. La utilización de segmentos de los genes V, D y J de camélido y regiones efectoras de camélido producirá anticuerpos de camélido con rasgos peculiares a camélidos, tales como bucles CDR3 alargados. El uso de segmentos de los genes V, D y J humanos que comprenden segmentos del gen V aleatoriamente seleccionados, o seleccionados o manipulados para solubilidad potenciada, producirá anticuerpos

solo de cadena pesada humanos funcionales.

Los anticuerpos obtenidos según la invención tienen la ventaja con respecto a aquellos de la técnica anterior en que son de sustancialmente cualquier clase individual o conocida y preferentemente de origen humano. Los anticuerpos son de alta afinidad resultantes de una combinación de recombinación VDJ y maduración por afinidad *in vivo*. Los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden aislarse, caracterizarse y fabricarse usando procedimientos bien establecidos conocidos para aquellos expertos en la materia.

El sitio de la cadena pesada heterólogo

En el contexto de la presente invención, el término 'heterólogo' significa una secuencia de nucleótidos o un sitio como se describe en el presente documento que no es endógeno para el mamífero en el que se localiza.

Un "sitio de la cadena pesada V_H " en el contexto de la presente invención se refiere a un micro-sitio mínimo que codifica un dominio V_H que comprende uno o más segmentos del gen V, uno o más segmentos del gen D y uno o más segmentos del gen J, operacionalmente ligados a una o más regiones efectoras de la cadena pesada (careciendo cada una de un dominio C_{H1}). Preferentemente, la fuente primaria de variabilidad del repertorio de anticuerpos es la región CDR3 formada por la selección de segmentos de los genes D y J por las uniones V-D y D-J.

La ventaja de la presente invención es que el repertorio de anticuerpos y la diversidad obtenida en las secuencias de genes de V_H reorganizadas pueden maximizarse mediante el uso de múltiples segmentos de los genes D y J. La posterior mutación somática se logra mientras se usa un sitio mínimo (micro-sitio) sin la necesidad de un gran número de segmentos del gen V o los sitios de inmunoglobulina V_L y L_C (cadena ligera).

Preferentemente, el sitio de la cadena pesada V_H comprende de dos a cinco (2, 3, 4 ó 5) segmentos del gen V derivados de cualquier especie de vertebrado.

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

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

Preferentemente, el sitio de la cadena pesada V_H comprende de dos a veinte (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20) o más segmentos del gen J. Los segmentos del gen J pueden derivarse de cualquier especie de vertebrado pero, lo más preferentemente, los segmentos del gen J son segmentos del gen J humanos (normalmente 6 segmentos del gen J).

Preferentemente, el sitio de la cadena pesada V_H comprende dos o más segmentos del gen V, veinticinco segmentos del gen D humanos funcionales y 6 segmentos del gen J humanos.

El término 'segmento del gen V' engloba un segmento del gen V que se produce naturalmente derivado de un vertebrado, que incluye camélidos y humano, que se han seleccionado, mutado o manipulado opcionalmente para características mejoradas, tales como solubilidad. Los segmentos del gen V también se encuentran en otras especies tales como tiburón (véase Kokubu y col., (1988) EMBO. J., 7,3413-3422) o se han desarrollado para proporcionar diversas familias de proteínas de unión similares a V_H ejemplificadas, por ejemplo, en la evolución del repertorio de la cadena ligera de la inmunoglobulina V_L o el repertorio de V_H del receptor de linfocitos T.

Procedimientos preferidos de mejora de la solubilidad de un dominio V_H incorporan medios racionales, a diferencia de solo aleatorios, y se ejemplifican en Davies y Reichmann, (1996) Protein Eng., 9 (6), 531-537 y Riechmann y Muildermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38. También puede producirse selección natural *in vivo* mediante maduración por afinidad y la incorporación de mutaciones favorables en el gen V_H tras la reorganización VDJ.

El segmento del gen V debe ser capaz de recombinarse con un segmento del gen D, un segmento del gen J y una región constante de la cadena pesada (efectora) (que puede comprender varios exones, pero excluye un exón C_{H1}) según la presente divulgación para generar un anticuerpo solo de cadena pesada V_H cuando se expresa el ácido nucleico.

Un segmento del gen V según la presente divulgación también incluye dentro de su alcance cualquier secuencia de genes que codifica un fragmento de homólogo, derivado o proteína, que puede recombinarse con un segmento del gen D, un segmento del gen J y una región constante de la cadena pesada (que comprende uno o más exones, pero no un exón C_{H1}) según la presente divulgación para generar un anticuerpo solo de cadena pesada como se define en el presente documento.

Así, secuencias codificantes de V_H pueden derivarse de una fuente que se produce naturalmente o pueden sintetizarse usando procedimientos familiares para aquellos expertos en la materia.

5 Un "dominio V_H " en el contexto de la presente invención se refiere a un producto de expresión de un segmento del gen V cuando se recombina con un segmento del gen D y un segmento del gen J como se han definido anteriormente. Preferentemente, el dominio V_H como se usa en el presente documento sigue en disolución y es activo en un medio fisiológico sin la necesidad de ningún otro factor para mantener la solubilidad. Preferentemente, la capacidad del dominio V_H soluble para unirse a antígeno se ha mejorado por recombinación VDJ y mutación somática. No hay dependencia de la presencia o ausencia del bucle CDR3 alargado peculiar a las especies de camélido. El dominio V_H puede unirse a antígeno como un monómero y, cuando se combina con regiones efectoras constantes, puede producirse en formas mono-específicas, bi-específicas, multi-específicas, bi-valentes o multivalentes, dependiente de la elección y manipulación de las moléculas efectoras usadas (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, etc.) o mecanismos alternativos de dimerización y multimerización. Cualquier probabilidad de unión con un dominio V_L cuando se expresa como parte de un complejo de anticuerpo solo de cadena pesada soluble se ha eliminado por eliminación del exón C_H1 (véase Sitia y col., (1990) Cell, 60, 781-790). El dominio V_H solo también puede manipularse con diversos dominios de proteína para producir proteínas de fusión para fin terapéutico y de diagnóstico diana, por ejemplo, con toxinas, enzimas y agentes de obtención de imágenes.

20 En el contexto de la presente invención, los términos 'un segmento del gen D' y 'un segmento del gen J' incluyen secuencias de segmentos de los genes D y J que se producen naturalmente. Preferentemente, los segmentos de los genes D y J se derivan del mismo vertebrado del que el segmento del gen V se deriva. Por ejemplo, si un segmento del gen V se deriva de un humano y luego se solubiliza o manipula, los segmentos de los genes D y J también se derivan preferentemente de un ser humano. Alternativamente, los segmentos del gen V pueden derivarse, por ejemplo, de camello y los segmentos de los genes D y J de ser humano o viceversa.

Los términos segmento del gen D y segmento del gen J también incluyen dentro de su alcance derivados, homólogos y fragmentos de los mismos en tanto que el segmento resultante pueda recombinarse con los restantes componentes de un sitio de anticuerpo de la cadena pesada como se describe en el presente documento para generar un anticuerpo solo de cadena pesada como se describe en el presente documento. Los segmentos de los genes D y J pueden derivarse de fuentes que se producen naturalmente o pueden sintetizarse usando procedimientos familiares para aquellos expertos en la materia y descritos en el presente documento. Los segmentos de los genes V, D y J pueden recombinarse y preferentemente experimentar mutación somática.

35 Los segmentos de los genes V, D y J se derivan preferentemente de una única especie de vertebrado. Ésta puede ser cualquier especie de vertebrado, pero es preferentemente un ser humano.

Además, un sitio de la cadena pesada heterólogo según la presente divulgación comprende una región de ADN que codifica una región constante de la cadena pesada que proporciona funciones efectoras *in vivo* (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD o isotipos de las mismas).

En el presente documento también se desvela un anticuerpo solo de cadena pesada específico de antígeno obtenido u obtenible mediante los procedimientos de la presente divulgación.

45 **La región constante de la cadena pesada**

Operacionalmente, una región constante de la cadena pesada está codificada por un segmento de gen que se produce naturalmente o manipulado que puede recombinarse con un segmento del gen V, un segmento del gen D y un segmento del gen J en un linfocito B. Preferentemente, la región constante de la cadena pesada se deriva de un sitio de inmunoglobulina.

Según este aspecto de la divulgación, cada región constante de la cadena pesada comprende esencialmente al menos un gen de la región constante de la cadena pesada, que se expresa sin un dominio C_H1 funcional de manera que pueda producirse la generación de anticuerpo solo de cadena pesada. Cada región constante de la cadena pesada también puede comprender uno o más exones de la región constante de la cadena pesada adicionales, que están seleccionados del grupo que consiste en C_δ , $C_{\gamma 1-4}$, C_μ , C_ϵ y $C_{\alpha 1-2}$ con la condición de que los genes de la región constante de la cadena pesadas adicionales tampoco expresen un dominio C_H1 funcional. Los segmentos de genes de la región constante de la cadena pesada se seleccionan dependiendo de la clase preferida o mezcla de clases de anticuerpos requeridas. Opcionalmente, el sitio de la cadena pesada heterólogo es deficiente en C_μ y C_δ .

60 Por ejemplo, se conocen moléculas de Ig de clase M por desempeñar una función importante en la activación de macrófagos y la ruta del complemento. Debido a la estrecha proximidad de sus sitios de unión, IgM tiene una alta avidéz por patógenos, que incluyen virus. Sin embargo, también se sabe que IgM es difícil de usar en técnicas de inmunoensayo rápidas mientras que la Ig de la clase G puede usarse fácilmente en estas técnicas. Para tales usos sería útil seleccionar la clase de anticuerpo preferido, es decir, IgG o IgM.

65

La expresión de todo o parte de un sitio $C\gamma$ de la cadena pesada heterólogo que carece de C_H1 producirá opcionalmente algunos o todos los isotipos de IgG, dependiente de los isotipos de IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 presentes en el sitio de IgG heterólogo. Alternativamente, las cadenas pesadas pueden comprender genes $C\epsilon$. La molécula de IgE resultante también podría usarse en terapia.

Alternativamente, pueden obtenerse mezclas de anticuerpos seleccionadas. Por ejemplo, IgA e IgM pueden obtenerse cuando la región constante de la cadena pesada comprende un gen $C\alpha$ y $C\mu$.

Preferentemente, la región constante de la cadena pesada según la presente divulgación es de origen humano, en particular cuando el anticuerpo de la cadena pesada va a usarse para aplicaciones terapéuticas en seres humanos. Si los anticuerpos de la cadena pesada van a usarse para fines de diagnóstico o veterinarios, la región constante de la cadena pesada se deriva preferentemente del organismo diana, vertebrado o mamífero en o sobre el que va a realizarse la terapia de diagnóstico o veterinaria.

Cuando se expresa, la región constante de la cadena pesada carece de un dominio C_H1 funcional. El exón C_H1 y, opcionalmente, las regiones constantes $C\mu$ y $C\delta$, pueden mutarse, delecionarse o sustituirse. Preferentemente, el exón C_H1 está delecionado. La presencia, por ejemplo, de IgM con un dominio C_H1 funcional inhibe la maduración de linfocitos B y, por consiguiente, limita la expresión productiva de IgG de solo cadena pesada (que carece de C_H1) dentro del mismo sitio, ya que se inhibe la maduración de linfocitos B.

Un 'exón de la región constante de la cadena pesada' ('exón C_H ') como se define en el presente documento incluye las secuencias de vertebrado que se producen naturalmente, pero especialmente de exones C_H de mamífero. Esto varía de un modo específico de clase. Por ejemplo, IgG e IgA carecen naturalmente de un dominio C_H4 . El término 'exón C_H ' también incluye dentro de su alcance derivados, homólogos y fragmentos del mismo en tanto que el exón C_H pueda formar un anticuerpo funcional de solo cadena pesada como se define en el presente documento cuando es un componente de una región constante de la cadena pesada.

Opcionalmente, cuando está presente, el dominio funcional C_H4 u otros dominios funcionales pueden manipularse o delecionarse dentro del transgén dado que un procedimiento tal no inhibe el proceso secretor intracelular, la maduración de linfocitos B o la actividad de unión del polipéptido de anticuerpo resultante.

Mamíferos

El mamífero transgénico usado en los procedimientos de la divulgación no es un ser humano. El mamífero transgénico es preferentemente un roedor tal como un conejo, cobaya, rata o ratón. Se prefieren especialmente ratones. También pueden emplearse mamíferos alternativos tales como cabras, ovejas, gatos, perros u otros animales.

Preferentemente se generan animales transgénicos usando tecnología de inyección de ovocitos establecida y, si está establecida, tecnología o clonación de células ES.

Ventajosamente, sitios de la cadena pesada de inmunoglobulina y opcionalmente ligera endógenos para el mamífero se delecionan o silencian cuando un anticuerpo solo de cadena pesada se expresa según los procedimientos de la divulgación.

Este enfoque de generación de anticuerpos solo de cadena pesada como se ha descrito anteriormente puede ser de uso particular en la generación de anticuerpos para uso terapéutico humano ya que frecuentemente la administración de anticuerpos a una especie de vertebrado que es de origen diferente de la fuente de los anticuerpos produce la aparición de una respuesta inmunitaria contra aquellos anticuerpos administrados.

Por tanto, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un mamífero transgénico que expresa un sitio de la cadena pesada heterólogo según la presente divulgación.

El mamífero transgénico puede manipularse para tener una capacidad reducida para producir anticuerpos que incluyen cadenas ligeras.

Las células productoras de anticuerpos pueden derivarse de animales transgénicos según la presente invención y usarse, por ejemplo, en la preparación de hibridomas para la producción de anticuerpos solo de cadena pesada como se ha definido en el presente documento. Además, o alternativamente, pueden aislarse secuencias de ácidos nucleicos de mamíferos transgénicos según la presente invención y usarse para producir anticuerpos solo de cadena pesada del dominio V_H o complejos bi-específicos/bifuncionales de los mismos, usando técnicas de ADN recombinante que son familiares para aquellos expertos en la materia.

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

Así, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para la producción de anticuerpos

solo de cadena pesada inmunizando un mamífero transgénico según la presente divulgación con un antígeno.

En un cierto aspecto de la divulgación, el mamífero es un ratón.

5 Anticuerpos solo de cadena pesada y fragmentos de los mismos

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un anticuerpo solo de cadena pesada obtenible según un procedimiento de la presente divulgación y fragmentos y derivados funcionales del mismo. Fragmentos que engloban el dominio de unión V_H pueden derivarse por escisión enzimática o escisión con bromuro de cianógeno de un anticuerpo solo de cadena pesada de la divulgación, es decir, que carece de cadenas ligeras (Jaton y col., (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195).

Un fragmento funcional preferido es un dominio de unión solo de cadena pesada específico de antígeno, es decir, un dominio de unión V_H , como se expresa por el sitio V_H como resultado de recombinación entre segmentos de los genes V, D y J individuales, seguido posteriormente de mutación somática. Según este aspecto de la invención, los sitios de V_H pueden clonarse a partir de, por ejemplo, ARNm aislado de una célula productora de anticuerpos de un animal transgénico inmunizado como se ha descrito anteriormente. Las secuencias clonadas pueden entonces expresarse usando un fago (Ward y col., (1989) Nature, 341, 544-546) o bibliotecas de muestra similares, por ejemplo, usando sistemas basados en levadura (Boder y Wittrup, (1997) Nat. Biotechnol., 15, 553-7) y dominios de unión V_H específicos de antígeno identificados. Los dominios de unión de la cadena pesada específicos de antígeno pueden entonces fabricarse bien solos o como proteínas de fusión en sistemas de expresión bacterianos, de levadura o alternativos escalables. Secuencias que codifican dominios de unión V_H también pueden clonarse a partir de hibridomas caracterizados derivados por procedimientos clásicos de ratones transgénicos inmunizados. Éstos pueden entonces usarse para la producción de dominios de unión V_H y derivados de los mismos que incluyen la manipulación de clases de anticuerpos definidos (por ejemplo, IgE o IgA) y variantes de los mismos con diferentes funciones efectoras.

Por consiguiente, en el presente documento se desvela un procedimiento de producción de un dominio de unión V_H que comprende las etapas de:

- a) aislar una célula o tejido que expresa un anticuerpo solo de cadena pesada específico de antígeno de interés (preferentemente un anticuerpo solo de cadena pesada específico de antígeno soluble de interés);
- b) clonar la secuencia que codifica el dominio de unión V_H de ARNm derivado de la célula aislada o tejido;
- c) expresar la proteína codificada usando un fago o biblioteca similar;
- d) identificar dominios de unión V_H específicos de antígeno, y
- e) expresar los dominios de unión V_H solos o como una proteína de fusión en sistemas de expresión bacterianos, de levadura, de mamífero o alternativos.

Alternativamente, los fragmentos que contienen dominio V_H pueden generarse a partir de anticuerpos solo de cadena pesada de la divulgación usando tecnología de escisión enzimática o química y posterior separación del fragmento que contiene dominio V_H de los otros productos de escisión.

Si el dominio de unión V_H se aísla de un hibridoma caracterizado, la secuencia del dominio de unión V_H clonada derivada de ARNm puede clonarse directamente en un vector de expresión sin recurrir a etapas de selección adicionales usando sistemas de expresión en fago y otros sistemas de expresión.

Los sistemas de producción para anticuerpo solo de cadena pesada que incorporan regiones efectoras incluyen células de mamífero en cultivo (por ejemplo, células CHO), plantas (por ejemplo, maíz), cabras transgénicas, conejos, ganado vacuno, ovejas, pollos y larvas de insecto adecuadas para la tecnología de cría masiva. Otros sistemas de producción, que incluyen infección por virus (por ejemplo, baculovirus en larvas de insecto y líneas celulares) son alternativas a los enfoques de cultivo celular y de línea germinal. Otros procedimientos de producción también serán familiares para aquellos expertos en la materia. Si hay un requisito de ensamblaje de IgA o IgM solo de cadena pesada, la co-expresión de una "cadena de J" es beneficiosa. Procedimientos adecuados para la producción de anticuerpo solo de cadena pesada de camélido o dominios de unión V_H solos se conocen en la técnica. Por ejemplo, se han producido dominios de unión V_H de camélido en sistemas bacterianos y homodímeros solo de cadena pesada de camélido en hibridomas y células de mamífero transfectadas (véase Reichmann y Muildermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38).

Los procedimientos también están bien establecidos para la expresión de dominios de unión V_H humanos manipulados derivados usando tecnología de expresión en fago (Tanha y col., (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780 y referencias en su interior).

Se ha mostrado que larvas de insectos de líneas de moscas transgénicas producen fragmentos de anticuerpos solo de cadena pesada funcionales en hemolinfa con características indistinguibles del mismo anticuerpo producido por células de mamífero (documento PCT/GB2003/0003319). La presente invención también proporciona un dominio de unión V_H monómero o dímero específico de antígeno obtenible según el procedimiento de este aspecto de la

presente invención.

En el presente documento también se desvela una secuencia de polinucleótidos que consiste en el sitio de la cadena pesada heterólogo, un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo solo de cadena pesada de la divulgación y un vector que comprende un sitio de la cadena pesada heterólogo, o fragmento del mismo, o polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo solo de cadena pesada según la presente divulgación.

En el presente documento también se desvela una célula huésped transformada con un sitio de la cadena pesada heterólogo, o fragmento del mismo, o polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo solo de cadena pesada o fragmento de anticuerpo, según la presente divulgación.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un complejo de polipéptido que comprende un dominio de unión V_H específico de antígeno según la presente invención que tiene unido al mismo un resto efector que proporciona actividad efectora. Esta actividad efectora puede ser además de la proporcionada por la región constante de la cadena pesada y puede situarse en el extremo amino o carboxi de la molécula. Estos complejos de polipéptido retienen la función fisiológica conferida por el dominio de unión V_H específico de antígeno en combinación con funciones que eligen diana o efectoras adicionales de los restos efectores. Tales complejos de polipéptido pueden estar en forma de monómeros funcionales o, dependiendo del diseño e interacción de restos efectores, dímeros, tetrámeros, pentámeros, multímeros u otros complejos que incorporan diferentes dominios de unión V_H , confiriendo así multivalencia y multi-especificidad. Los dominios de unión V_H pueden estar presentes en el extremo amino o carboxi de la molécula de unión (véase la Figura 1 para ejemplo dimérico).

Si el resto efector comprende un dominio de unión, puede tener una especificidad diferente del dominio de unión V_H específico de antígeno. La ventaja de esta disposición es que el complejo de polipéptido puede facilitar la reticulación de diferentes dianas. Por ejemplo, un complejo de polipéptido biespecífico puede utilizarse para potenciar las interacciones célula-célula e interacciones célula/patógeno. En esta realización, los complejos de polipéptido de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, para tender puentes entre dos tipos de células tales como un patógeno y un macrófago (véase Biburger y col., (2005) *J. Mol. Biol.*, 346, 1299-1311). El uso de dominios de unión V_H es preferible al uso de dominios de unión scFV en tales diseños bi-específicos. Los dominios de unión V_H tienen alta afinidad de unión y pueden incorporarse en tales complejos de polipéptido con construcción de vector mínima y en ausencia de consideraciones de diseño necesarias para mantener la especificidad y afinidad de scFV con respecto a su molécula parental tetrámera. Donde se prevén dímeros o complejos de polipéptido multímeros se incorporan dominios de dimerización, por ejemplo, la inclusión de dominios C_H2 y C_H3 derivados de regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (véase la Figura 2).

El término 'resto efector' como se usa en el presente documento incluye cualquier resto que medie en un efecto biológico deseado sobre una célula. El resto efector es preferentemente soluble y puede ser un péptido, polipéptido o proteína, o puede ser una estructura no peptídica. Por ejemplo, el resto efector puede ser una enzima, hormona, citocina, fármaco, pro-fármaco, toxina, en particular una toxina de proteína, un radionúclido en una estructura quelante, un dominio de unión, un dominio dimerizante o de interacción, un agente de obtención de imágenes, albúmina o un agente inhibidor.

La albúmina puede utilizarse como resto efector para aumentar la estabilidad o propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas del dominio de unión V_H específico de antígeno (Sung y col., (2003) *J. Interferon Cytokine Res.*, 23 (1): 25-36). Alternativamente, el resto efector puede ser una estructura PEGilada o una estructura naturalmente glucosilada de manera que se mejoren las propiedades farmacodinámicas.

El resto efector puede unirse peptídicamente al dominio de unión V_H específico de antígeno o puede unirse químicamente al dominio V_H pesado específico de antígeno, por ejemplo, usando una estructura de enlace química tal como un ligador de maleimida. Alternativamente, los complejos de polipéptido de la invención pueden expresarse como proteínas de fusión. Como tal, la presente invención también engloba una secuencia de polinucleótidos que consiste en el sitio de la cadena pesada heterólogo, o un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo solo de cadena pesada, de la presente invención en el que el polinucleótido comprende además, en marco de lectura, uno o más exones que codifican un resto efector. Este exón puede estar en el extremo 5' o 3' del polinucleótido. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender, en el siguiente orden y en marco de lectura, un V_H y un segmento de gen de dominio de unión/resto efector.

En el caso de fusiones genéticas, la unión de los diversos dominios puede lograrse usando una construcción de ADN recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión, con el ADN que codifica los diversos dominios situado en el mismo marco de lectura. Tales construcciones son de valor como diagnósticas y terapéuticas. Como diagnósticos, el dominio efector puede ser una proteína fluorescente (por ejemplo, GFP) o enzima (por ejemplo, β -gal). Alternativamente, el dominio efector puede ser una marca para unión potenciada a un sustrato (por ejemplo, polihistidina o una biotina), un antígeno para proporcionar un sitio de unión para anticuerpos secundarios o una cremallera de leucina o motivo de unión similar que puede servir de un sitio para la unión de marcadores fluorescentes.

Complejos de polipéptido

Los presentes inventores también se han dado cuenta de que es posible producir un complejo de polipéptido bi-valente o multi-valente que comprende al menos parte de una cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación con una cadena (ligera) efectora separada que comprende un dominio de ensamblaje complementario y que tiene actividad efectora adicional. Los complejos de polipéptido según la presente invención retienen la función fisiológica conferida por la región constante de la cadena pesada en combinación con funciones de restos efectores adicionales asociadas a la cadena efectora (Figura 3).

Como tal, en un tercer aspecto, el complejo de polipéptido comprende cadenas pesadas en combinación con una o más cadenas efectoras (cadenas ligeras). Este aspecto de la presente divulgación proporciona un complejo de polipéptido que comprende un par de cadenas pesadas y un par de cadenas efectoras, en el que:

el par de cadenas pesadas están asociadas entre sí;
 una de las cadenas efectoras está asociada a una de las cadenas pesadas y la otra de las cadenas efectoras está asociada a la otra de las cadenas pesadas;
 cada cadena pesada comprende un dominio de unión, un dominio de dimerización, que comprende preferentemente al menos dominios de la región constante C_{H2} , C_{H3} y, opcionalmente, C_{H4} , y un resto efector que puede unirse a un dominio de ensamblaje complementario de la cadena efectora; y
 la cadena efectora comprende un dominio de ensamblaje complementario que tiene unido al mismo un resto efector,
 en el que el dominio de ensamblaje y el dominio de ensamblaje complementario se asocian entre sí mediante interacciones no covalentes.

Preferentemente, el resto efector en la cadena pesada es diferente al resto efector en la cadena efectora.

Opcionalmente, el complejo de polipéptido incluye un dominio similar a bisagra flexible en el extremo carboxilo del dominio C_{H3} (o dominio C_{H4} , si está presente) que lo enlaza con el dominio de ensamblaje. Preferentemente, el complejo de polipéptido incluye un dominio bisagra natural o un dominio similar a bisagra manipulado flexible entre el dominio de unión y el dominio C_{H2} . La presencia de regiones bisagra facilita la función independiente de dominios de unión y restos efectores en los complejos de polipéptido resultantes.

El resto efector en la primera cadena pesada de polipéptido tiene opcionalmente una especificidad diferente de la especificidad del resto efector en la segunda cadena pesada de polipéptido. Según la presente invención, el resto efector del complejo de polipéptido puede sustituirse con un dominio de unión. Preferentemente, el dominio de unión comprende un dominio V_H (como se define en el primer aspecto de la invención) o un dominio de unión de receptor de célula. La proteína de unión dímera tetravalente resultante (complejo de polipéptido) puede comprender hasta cuatro restos efectores diferentes. Preferentemente, los restos efectores en el extremo amino de la cadena pesada son idénticos, y aquellos en el extremo carboxilo son idénticos (pero reconocen un antígeno o epítipo diferente a aquel en el extremo amino), facilitando el ensamblaje de un único homodímero. Una molécula tal puede demostrar ser ventajosa para la captura de patógenos, funcionalidad efectora que es proporcionada por la inclusión de dominios funcionales de la cadena pesada apropiados (por ejemplo, IgA o IgM).

Un complejo de polipéptido a modo de ejemplo según el tercer aspecto de la invención es útil para marcado citoquímico, procedimientos que eligen diana o terapia. Por ejemplo, si la molécula efectora comprende un dominio de unión V_H específico de antígeno que elige como diana un marcador de superficie de célula cancerosa y el resto efector comprende un dominio de unión específico para una enzima convertora de pro-fármaco (la cadena efectora). El dominio de unión V_H específico de antígeno se une a la diana y lleva el resto efector a estrecha proximidad con la diana de forma que tras la unión de la cadena efectora pueda ejercer un efecto biológico sobre la diana en presencia del pro-fármaco (por ejemplo, nitrorreductasa con CB1954). La inclusión de función efectora de la cadena pesada de la inmunoglobulina como dominio de dimerización también puede ser beneficiosa en la eliminación de la célula diana.

La cadena efectora

La cadena efectora comprende un dominio de unión complementario y un resto efector, que se asocia a una cadena pesada mediante el resto efector de la cadena pesada para formar el complejo de unión de polipéptido ensamblado. El dominio de ensamblaje complementario de la cadena efectora puede ser un componente integral del resto efector o una proteína o ligando alternativo fusionado o químicamente ligado al resto efector. Las cadenas pesadas del complejo de unión de polipéptido ensamblado se unen a la diana y ponen el resto de cadena (ligera) efector en estrecha proximidad con la diana de forma que pueda ejercer un efecto biológico de la diana.

El resto efector

El término 'resto efector' como se usa en el presente documento incluye cualquier resto que medie en un efecto biológico deseado sobre una célula. El dominio efector puede ser una célula, por ejemplo, un linfocito T, un péptido,

polipéptido o proteína, o puede ser una estructura no peptídica. Por ejemplo, el dominio efector puede ser una enzima, fármaco, pro-fármaco, toxina, en particular una toxina de proteína, un radionúclido en una estructura quelante o dominio de unión. El resto efector asociado al dominio de ensamblaje complementario puede ser de naturaleza celular, proteinácea, orgánica o inorgánica, dependiente del efecto deseado.

5 El término 'dominio de unión' como se usa en el presente documento con respecto a todos los aspectos anteriores de la presente invención incluye cualquier dominio de polipéptido que sea activo en un medio fisiológico. Un dominio de unión tal debe también tener la capacidad para unirse a una diana bajo condiciones fisiológicas.

10 Tales dominios de unión incluyen dominios que pueden mediar en la unión o adhesión a una superficie celular. Dominios adecuados que pueden usarse en los complejos de polipéptido de la invención son moléculas de adhesión a células de mamífero, procariotas y virales, citocinas, factores de crecimiento, antagonistas o agonistas de receptores, ligandos, receptores de la superficie celular, factores reguladores, proteínas y péptidos estructurales, proteínas del suero, proteínas secretadas, proteínas asociadas a plasmalema, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos protozoicos, antígenos parasíticos, lipoproteínas, glucoproteínas, hormonas, neurotransmisores, factores de coagulación, Fv de cadenas individuales manipuladas y similares. Preferentemente, el dominio de unión es un dominio V_H de vertebrado, más preferentemente un dominio V_H de mamífero tal como un dominio V_H humano.

20 Un dominio de unión puede comprender un dominio de camélido V_H (V_{HH}) o puede comprender un dominio V_H obtenido de un no camélido. Preferentemente, el dominio de unión es un dominio V_H humano. Los dominios de unión V_H son preferentemente de origen de linfocitos B derivados de animales transgénicos o camélidos (como se ha descrito anteriormente), a diferencia de dominios V_H derivados de bibliotecas de fagos sintéticos, ya que el primero será de mayor afinidad debido a su generación en respuesta a exposición a antígeno *in vivo* mediante transposición de VDJ y mutación somática.

25 Si el resto efector comprende un dominio de unión, preferentemente tiene diferente especificidad del dominio de unión en la cadena pesada. La ventaja de esta disposición es que el complejo de polipéptido puede facilitar la reticulación de diferentes dianas o se une a diferentes antígeno sobre una célula diana (por ejemplo, patógeno).

30 El dominio de unión en la primera cadena pesada puede tener una especificidad diferente de la del dominio de unión en la segunda cadena pesada. De esta forma, el complejo de polipéptido será al menos bivalente y podrá reticular diferentes dianas y el dominio efector podrá ejercer su efecto sobre ambas dianas. Puede crearse un complejo de polipéptido multivalente mediante la asociación de estas cadenas pesadas tetravalentes con cadenas efectoras que comprenden dominios efectores con especificidad(es) y funcionalidad todavía diferentes. Por tanto, el resto efector en la primera cadena pesada puede tener una especificidad diferente del resto efector en la segunda cadena pesada, permitiendo la captura de más de una cadena efectora, llevando cada una una funcionalidad diferente.

40 **El dominio de ensamblaje complementario se une a un resto efector**

45 Cuando una cadena pesada se asocia con un cadena efectora, los términos 'resto efector' y 'dominio de ensamblaje complementario' como se usan en el presente documento incluyen cualquier resto que pueda formar al menos una unión no covalente entre sí. Por ejemplo, el resto efector y el dominio de ensamblaje complementario pueden ser una proteína, fragmento de péptido o secuencia consenso que puede formar una interacción proteína-proteína, tal como la observada entre: el dominio C_{H1} de una cadena pesada de la inmunoglobulina y la región constante de una cadena ligera de la inmunoglobulina; cremalleras de leucina; VCAM y VLA-4; integrinas y proteínas de la matriz extracelular; integrinas y moléculas de la superficie celular tales como CD54 o CD 102; ALCAM y dominios de SRCR; un scFv y antígeno o dominio de unión V_H y antígeno.

50 **Las cadenas pesadas**

55 Cuando los dominios de dimerización de las cadenas pesadas comprendan regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina, las regiones constantes (exones C_H) pueden dar más funcionalidad fisiológica al complejo de unión de polipéptido. En particular, los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina pueden proporcionar, entre otros, fijación de complemento, activación de macrófagos y unión a receptores Fc, dependiendo de la clase o subclase de los dominios constantes de anticuerpo.

60 Como se trata anteriormente, está muy documentado que la clase de cadena pesada expresada tiene una función importante en la función efectora *in vivo*. Una línea celular establecida puede producir un complejo de polipéptido que tiene un efecto de elección de diana y biológico útil, pero la región constante de la cadena pesada puede ser de una clase que es diagnósticamente o terapéuticamente no deseable, o puede no secretarse en cantidades útiles. Por consiguiente, los dominios constantes de la cadena pesada de los complejos de polipéptido de la invención pueden alterarse específicamente o parcialmente u omitirse completamente para introducir o eliminar componentes de cadena pesada de las inmunoglobulinas.

65 Por ejemplo, las moléculas de Ig de clase M son conocidas por desempeñar una función importante en la

activación de macrófagos y la ruta del complemento. Debido a la estrecha proximidad de sus sitios de unión, la IgM tiene una alta avidéz por patógenos, que incluyen virus. Sin embargo, la IgM también es conocida por ser difícil para su uso en técnicas de inmunoensayo rápidas, mientras que la Ig de clase G puede usarse fácilmente en estas técnicas. Para tales usos sería útil cambiar la clase de la cadena pesada de dominios μ a γ .

5 La expresión del sitio C_γ de la cadena pesada solo producirá IgG, que incluye isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, algunos de los cuales también activarán el complemento. Los anticuerpos IgG se unen y activan macrófagos y granulocitos, y pueden cruzar la placenta.

10 Previamente se han tratado aplicaciones adicionales de diversas clases de anticuerpos.

Las regiones constantes de las cadenas pesadas de los complejos de polipéptido de la presente invención pueden ser de origen humano, de conejo, rata o ratón como se ha definido en el presente documento. Preferentemente, son de origen humano.

15 Los complejos de polipéptido de la presente invención también pueden usarse únicamente para bloquear la unión de ligandos a sus receptores usando dominios de dimerización que no proporcionan funciones efectoras. Pueden bloquearse múltiples receptores por un complejo de polipéptido multi-específico.

20 En un cuarto aspecto de la invención, la molécula efectora puede comprender un dominio de dimerización de forma que la molécula efectora pueda asociarse con una molécula efectora separada. Este dominio de dimerización puede comprender uno o más de dominios de la región constante del anticuerpo C_{H2} , C_{H3} o C_{H4} y/o una cadena J. En esta realización de la invención, dos o más moléculas efectoras pueden asociarse para producir un dímero o multímero de moléculas efectoras. Las moléculas efectoras pueden ser las mismas (permitiendo la producción de un homodímero u homomultímero de molécula efectora) o diferentes (permitiendo la producción de un heterodímero o heteromultímero de molécula efectora). Preferentemente, el dímero o multímero de molécula efectora es bi-valente o multi-valente. Preferentemente, las regiones constantes para las dos o más moléculas efectoras (es decir, los dominios de dimerización) son idénticos, reduciendo así la posibilidad de heterogeneidad de producto.

30 Según el cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un complejo de polipéptido que comprende un dímero que consiste en una primera cadena pesada de polipéptido y una segunda cadena pesada de polipéptido en el que:

35 cada cadena pesada de polipéptido comprende un dominio de unión y un dominio de dimerización que opcionalmente comprende al menos dominios de la región constante de anticuerpos C_{H2} , C_{H3} y, opcionalmente, C_{H4} ; y, opcionalmente, un resto efector, en el que, preferentemente:

40 el dominio de unión en la primera cadena pesada de polipéptido tiene la misma especificidad que el dominio de unión en la segunda cadena pesada de polipéptido; y las regiones constantes (dominios de dimerización) para las dos cadenas pesadas de polipéptido son idénticas.

Preferentemente, la primera y segunda cadenas tienen el mismo resto efector.

45 Preferentemente, el dominio de dimerización comprende al menos dominios de la región constante de anticuerpos C_{H2} , C_{H3} y, opcionalmente, C_{H4} .

En el presente documento también se desvela un complejo de polipéptido que comprende una pluralidad de dímeros de la cadena pesada de polipéptidos y una cadena J, en el que:

50 la pluralidad de dímeros de la cadena pesada de polipéptidos se ensamblan por la cadena J; cada cadena pesada de polipéptido comprende un dominio de unión y dominios μ , ϵ , α o γ C_{H2} , C_{H3} y, opcionalmente, C_{H4} idénticos; y hay al menos dos dominios de unión que tienen diferentes especificidades en el complejo de polipéptido (véanse las Figuras 4 y 5).

55 Como se define para el primer aspecto de la invención anteriormente, cada región constante de la cadena pesada comprende preferentemente al menos un gen de la región constante de la cadena pesada, que se expresa sin un dominio C_{H1} funcional de manera que pueda producirse la generación de anticuerpo solo de cadena pesada. Cada región constante de la cadena pesada también puede comprender uno o más genes de la región constante de la cadena pesada adicionales, que están seleccionados del grupo que consiste en C_δ , $C_{\gamma 1-4}$, C_μ , C_ϵ y $C_{\alpha 1-2}$ con la condición de que los genes de la región constante de la cadena pesada adicionales tampoco expresen un dominio C_{H1} funcional. Los genes de la región constante de las cadenas pesadas están seleccionados dependiendo de la clase preferida o mezcla de clases de anticuerpos requerida.

65 Preferentemente, solo hay dos dominios de unión de diferentes especificidades en IgA e IgM expresadas.

En una realización, las cadenas pesadas incluyen cada una un dominio C_{H4}, los dominios constantes son dominios α y el complejo de polipéptido incluye una cadena J.

5 En otra realización, las cadenas pesadas incluyen cada una un dominio C_{H4}, los dominios constantes son dominios μ y el anticuerpo incluye una cadena J.

Ensamblaje del complejo de polipéptido

10 La disposición de modelos modulares de complejos de polipéptido de la presente invención les permite construirse en un gran número de posibles permutaciones. Tales alteraciones en la arquitectura del dominio y secuencia de aminoácidos del complejo de polipéptido puede lograrse por mutación adecuada o síntesis parcial y sustitución de regiones apropiadas de las secuencias codificantes de ADN correspondientes. Dominios sustitutos o adicionales pueden obtenerse de secuencias de ADN recombinante compatibles. Por ejemplo, las cadenas pesadas pueden incluir una bisagra natural o dominio de polipéptido flexible manipulado tanto entre el dominio de unión como el extremo amino del dominio C_{H2} y entre el dominio efector y el extremo C de la cadena pesada (C_{H3} o C_{H4}).

15 Las cadenas pesadas en el complejo de polipéptido de la invención se expresan como proteínas de fusión. Las cadenas efectoras en el complejo de polipéptido de este aspecto de la invención pueden expresarse como proteínas de fusión o pueden ensamblarse por medios químicos o, si es de naturaleza celular, pueden aislarse de sangre o tejido, o capturarse *in vivo* (por ejemplo, albúmina).

20 En el caso de fusiones genéticas, la unión de los diversos dominios puede lograrse usando una construcción de ADN recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión, con el ADN que codifica los diversos dominios situado en el mismo marco de lectura.

25 El resto efector, si está presente como parte de una proteína de fusión, puede localizarse en cualquiera del extremo amino o carboxi del dominio de ensamblaje complementario.

30 Alternativamente, los dominios en la cadena efectora pueden ensamblarse por procedimientos químicos de péptidos normales, como ya se conoce en la técnica, en vez de ser sintetizados como una proteína de fusión.

35 El enlace puede ser mediante un enlace peptídico o mediante enlace químico. Por ejemplo, el resto efector puede enlazarse peptídicamente al dominio de ensamblaje complementario o puede unirse químicamente al dominio de ensamblaje complementario, por ejemplo, usando una estructura de enlace químico tal como un ligador de maleimida.

40 El resto efector puede posicionarse en cualquier localización en la cadena pesada. Por ejemplo, el resto efector puede situarse en el extremo C de la cadena pesada o entre el dominio de unión y tanto el dominio C_{H2} como el dominio bisagra del complejo de polipéptido. Se prefiere que el dominio de ensamblaje no se sitúe entre los dominios C_{H2} y C_{H3} ya que esto podría interferir con una función efectora y los dominios de dimerización. Preferentemente, el resto efector está unido al extremo amino o extremo carboxi de la cadena pesada mediante un ligador flexible peptídico o región similar a bisagra de manera que se facilite la unión/función independiente de restos efectores.

45 Secuencias de polinucleótidos, vectores y células huésped

La presente invención también proporciona una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena pesada de uno cualquiera de los complejos de polipéptido de la presente invención, un vector que comprende una o más de las secuencias de polinucleótidos citadas anteriormente y una célula huésped transformada con un vector que codifica la cadena pesada de un complejo de polipéptido de la presente invención. Los polinucleótidos incluyen preferentemente secuencias que permiten que las cadenas pesadas expresadas se secreten como homodímeros en el medio en el que la célula huésped está creciendo. La célula huésped puede ser de cualquier origen, que incluye células bacterianas y de levadura, pero es preferentemente una célula huésped de vertebrado, más preferible una célula huésped de mamífero.

55 La transfección de la misma célula huésped con un segundo vector que codifica una cadena pesada que comprende un dominio de unión con especificidad por una diana diferente produce co-expresión de las dos construcciones y el ensamblaje de una mezcla de homodímeros y heterodímeros. Los homodímeros mostrarán especificidad por el antígeno relacionado y los heterodímeros se unirán a ambos antígenos.

60 La presente invención también proporciona una célula huésped transformada con un vector que codifica al menos una cadena efectora de un complejo de polipéptido de la presente invención. La célula huésped puede ser de cualquier origen, que incluye una célula bacteriana o de levadura, pero es preferentemente una célula huésped de vertebrado, más preferentemente una célula huésped de mamífero. Alternativamente, la cadena efectora puede sintetizarse usando procedimientos que se conocen en la técnica.

65

La presente invención también proporciona una célula huésped transformada con un vector que codifica al menos una cadena pesada de un complejo de polipéptido de la presente invención. La célula huésped puede ser de cualquier origen, que incluye una célula bacteriana o de levadura, pero es preferentemente una célula huésped de vertebrado, más preferible una célula huésped de mamífero. Alternativamente, la cadena pesada puede sintetizarse usando procedimientos que se conocen en la técnica.

La presente invención también proporciona una célula huésped transformada con un vector que codifica al menos una cadena pesada y al menos una cadena efectora de un complejo de polipéptido de la presente invención. La célula huésped puede ser de cualquier origen, que incluye una célula bacteriana o de levadura, pero es preferentemente una célula huésped de vertebrado, más preferible una célula huésped de mamífero. Alternativamente, las cadenas pueden sintetizarse independientemente y ensamblarse usando procedimientos que se conocen en la técnica.

En el presente documento también se desvela un organismo transgénico que expresa al menos un complejo de polipéptido homo- o hetero-dímero de cadena pesada de la presente invención. El organismo transgénico puede ser un vertebrado no humano o mamífero, una planta o un insecto.

En el presente documento también se desvela un procedimiento para la producción de anticuerpos solo de cadena pesada específicos de clase y dominios V_H de los mismos, según la divulgación, inmunizando un organismo transgénico de la presente invención con un antígeno.

En una realización preferida de este aspecto de la divulgación, el organismo es un ratón.

La producción de anticuerpos y complejos de polipéptido para aplicaciones sanitarias requiere sistemas de fabricación a gran escala, ejemplos de los cuales se tratan en detalle anteriormente. Tales sistemas incluyen plantas (por ejemplo, maíz), ganado vacuno y ovejas transgénicas, pollos y larvas de insecto adecuados para la tecnología de cría masiva. Otros sistemas de producción, que incluyen infección viral (por ejemplo, baculovirus en larvas de insecto y líneas celulares) como alternativa a enfoques de cultivo celular y de la línea germinal, también serán familiares para aquellos expertos en la materia.

Estos procedimientos, y otros procedimientos adecuados conocidos en la técnica, pueden usarse para la producción de complejos de unión de polipéptido de la invención. La producción de homodímeros y/o de heterodímeros puede lograrse usando estos procedimientos.

Usos de los anticuerpos solo de cadena pesada y complejos de polipéptido de la invención y divulgación

Los anticuerpos solo de cadena pesada y complejos de unión de polipéptido de la invención y divulgación tienen un gran número de aplicaciones.

Por ejemplo, los anticuerpos solo de cadena pesada y complejos de polipéptido de la invención y divulgación comprenden complejos de polipéptido bi- y multi-específicos. Estos complejos son particularmente ventajosos, por ejemplo, como terapéuticos para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas. Los anticuerpos solo de cadena pesada y complejos de unión de polipéptido de la invención y divulgación son útiles para marcado citoquímico, procedimientos de elección de diana, terapia y diagnósticos.

En terapia de mono-anticuerpo, escape de patógenos, por ejemplo, debido a una mutación que conduce a pérdida de un único sitio de unión, se abolirá el efecto terapéutico del anticuerpo. La producción de complejos de polipéptido heterodímeros que reconocen diferentes antígenos sobre el mismo patógeno puede vencer este problema. El uso de al menos dos dominios de unión que tienen diferentes especificidades en los complejos de polipéptido de la invención también puede utilizarse para potenciar tanto interacciones célula-célula como interacciones célula/patógeno.

En esta realización, los complejos de polipéptido de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, para unir mediante puentes complejos de polipéptido entre dos tipos de células tales como un patógeno y un macrófago, o una célula tumoral y un linfocito T. Alternativamente, el complejo de polipéptido puede reconocer dos o más epítopes sobre el mismo patógeno con función efectora que es proporcionada por la región constante de la cadena pesada sola.

Alternativamente, los complejos de unión de polipéptido bi-específicos pueden usarse para células diana y tejidos *in vivo*, luego posteriormente para capturar moléculas efectoras en circulación o agentes de obtención de imágenes. Por ejemplo, agentes que eligen como diana tumores bi-específicos pueden usarse para capturar complejos convertidores de pro-fármaco para la posterior conversión localizada de pro-fármaco en agente reactivo. Los complejos específicos de bi- y multi-unión en combinación con agentes efectores también pueden usarse para unir y destruir uno o más patógenos dependientes de la selección de dominios de unión. Alternativamente, la presencia de dos o más dominios de unión que reconocen diferentes antígenos sobre el mismo patógeno proporcionan ventajas clínicas y reducen la probabilidad de escape de patógeno y redundancia de fármaco como resultado de mutación dentro del patógeno.

En el presente documento se desvelan anticuerpos solo de cadena pesada o fragmentos de los mismos según el primer aspecto de la divulgación, cadenas de polipéptidos y complejos según la invención; y cadenas efectoras y complejos de polipéptido según otro aspecto de la divulgación. Todos son adecuados para uso farmacéutico en seres humanos, y así la invención y divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo solo de cadena pesada, cadena de polipéptidos, cadena efectora o complejo de polipéptido de la presente invención. La invención y divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo solo de cadena pesada, una cadena de polipéptidos, una cadena efectora o un complejo de polipéptido de la presente invención en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedad. Las cadenas pesadas y efectoras pueden formularse juntas o por separado, dependiendo del modo de administración y acción del medicamento.

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

Por ejemplo, los anticuerpos solo de cadena pesada o complejos de polipéptido pueden mezclarse con estabilizadores, particularmente si van a liofilizarse. La adición de azúcares (por ejemplo, manitol, sacarosa o trehalosa) es típica para dar estabilidad durante la liofilización, y un estabilizador preferido es manitol. La albúmina de suero humano (preferentemente recombinante) también puede añadirse como estabilizador. También pueden usarse mezclas de azúcares, por ejemplo, sacarosa y manitol, trehalosa y manitol, etc.

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

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

Generalmente, los anticuerpos solo de cadena pesada y complejos de polipéptido se utilizarán en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados.

Por tanto, en el presente documento se desvela un procedimiento para tratar un paciente, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al paciente. El paciente es preferentemente un ser humano, y puede ser un niño (por ejemplo, un bebé mayor o lactante), un adolescente o un adulto, pero generalmente será un adulto.

La invención y divulgación también proporciona anticuerpos solo de cadena pesada, cadenas de polipéptidos, cadenas efectoras o un complejo de polipéptido de la invención para su uso como medicamento.

La invención y divulgación también proporcionan el uso de los anticuerpos solo de cadena pesada, cadenas de polipéptidos, cadenas efectoras o complejos de polipéptido de cadena de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente.

Estos usos, procedimientos y medicamentos son preferentemente para el tratamiento de una de las siguientes enfermedades o trastornos: cicatrización, trastornos proliferativos de la célula que incluyen neoplasia, melanoma, tumores de pulmón, colorrectales, osteosarcoma, rectales, de ovario, sarcoma, de cuello uterino, esofágicos, de mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello y otros tumores sólidos; trastornos mieloproliferativos tales como leucemia, linfoma no Hodgkin, leucopenia, trombocitopenia, trastorno de angiogénesis, sarcoma de Kaposi; trastornos autoinmunes/inflamatorios que incluyen alergia, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis, psoriasis e inflamación de las vías respiratorias, asma, inmunotrasornos y rechazo de trasplante de órgano; trastornos cardiovasculares y vasculares que incluyen hipertensión, edema, angina, aterosclerosis, trombosis, septicemia, choque, lesión por reperusión e isquemia; trastornos neurológicos que incluyen enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral, esclerosis lateral amiotrófica y dolor; trastornos del desarrollo; trastornos metabólicos que incluyen diabetes mellitus, osteoporosis y obesidad, SIDA y enfermedad renal; infecciones que incluyen infección viral, infección bacteriana, infección fúngica e infección parasítica, afecciones patológicas asociadas a la placenta y otras afecciones patológicas y para su uso en inmunoterapia.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo solo de cadena pesada o complejo de unión de polipéptido de la presente invención y divulgación como un agente de obtención de imágenes de diagnóstico, pronóstico o terapéuticas. Además, la presente invención proporciona el uso de un homo- o heterodímero de la cadena pesada de la presente invención solo o en combinación con una o más cadenas efectoras (ligeras) de la presente invención como agente de obtención de imágenes terapéutico, un reactivo citoquímico o agente de diagnóstico.

La presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo solo de cadena pesada o un fragmento del mismo

como se describe en el presente documento como reactivo de unión intracelular, o una abzima. Fragmentos solo de cadena pesada de anticuerpos preferidos son dominios de unión V_H específicos de antígeno solubles.

La presente divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo monocatenario específico de antígeno o dominio de unión V_H según la presente divulgación como inhibidor de enzima o bloqueante de receptor. Fragmentos de anticuerpos solo de cadena pesada preferidos son dominios de unión V_H específicos de antígeno solubles.

La presente invención también proporciona el uso de un dominio V_H fusionado con una molécula efectora para su uso como agente terapéutico, de obtención de imágenes, diagnóstico, abzima o reactivo.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A y 1B: muestra un complejo de polipéptido que comprende un dominio de dimerización de dominio de unión (V_H) (opcionalmente C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}) y un resto efector (EM). Los dominios de unión y restos efectoros pueden posicionarse en los extremos amino o carboxi de los dominios de dimerización. Se indican ligadores flexibles (\leftarrow) y regiones bisagra (\int).

Figura 2A y 2B: muestra diferentes configuraciones de dominios de unión y la sustitución del resto efector con otros dominios de unión. A. Opción preferida ya que se producen homodímeros. No se requiere separación de productos. B. Se produce mezcla de homodímeros y heterodímeros. Se requiere separación de productos.

Figura 3: muestra un complejo de polipéptido de la cadena pesada en asociación con una cadena efectora. La cadena efectora comprende un dominio de unión complementario (CBD) y un resto efector (EM). CBD es reconocido por EM de cadena pesada. CBD está fusionado a o parte de efector, por ejemplo, enzima, toxina, quelante, agente de obtención de imágenes. La cadena efectora puede sintetizarse por separado de la cadena pesada.

Figura 4: muestra una IgA secretora bivalente en asociación con una cadena J.

Figura 5: muestra un complejo de polipéptido similar a IgM solo de cadena pesada multivalente ensamblado mediante una cadena J.

Figura 6: muestra la estrategia para la generación de ratones transgénicos que expresan un sitio IgG y la generación funcional de anticuerpos solo de cadena pesada y dominios V_H como resultado de exposición a antígeno.

Figura 7: muestra la estrategia para la generación de ratones transgénicos que expresan un sitio IgM y la generación funcional de anticuerpos solo de cadena pesada y dominios V_H como resultado de exposición a antígeno.

Figura 8: muestra la estrategia para la generación de ratones transgénicos que expresan un sitio IgA y la generación funcional de anticuerpos solo de cadena pesada y dominios V_H como resultado de exposición a antígeno.

Figura 9: Alineamiento de secuencias de los productos de PCR obtenidos a partir de ADNc de médula ósea usando cebadores de V_{HH1} y V_{HH2} en combinación con cebador de $C_{\gamma 2}$ humano de ratones que contienen un sitio con regiones constantes que tienen una mutación de corte y empalme de camélido para eliminar C_{H1} . Los resultados muestran que C_{H1} no se elimina.

Figuras 10-13: Estructura de construcciones de V_H / V_H de camélido (V_{HH}). 1-n representa cualquier número de genes de V_H , o segmentos D o J. El complemento normal del sitio humano es 51 genes V, 25 segmentos D funcionales (más 2 no funcionales) y 6 segmentos J. En caso de una región C_{μ} (para IgM) o C_{ϵ} (para IgE) no hay región H y hay un exón C_{H4} adicional entre C_{H3} y M1. El (Los) gen(es) de V_H se han mutado para proporcionar solubilidad como se describe en el dominio público

Los genes de V_H , segmentos D y J y exones C son preferentemente humanos, pero podrían ser de cualquier otra especie que incluye camélidos. En el último caso, los genes de V_H de camélido (V_{HH}) no se mutarían ya que son naturalmente solubles.

Figura 14: Programa de inmunización de ratones y ensayo de anticuerpos para la generación de IgG solo de cadena pesada contra HSP70 de *E. coli*.

Figura 15: Análisis de citometría de flujo y resultados de inmunohistoquímica para células del bazo derivadas de ratones transgénicos.

Figura 16: Resultados de análisis de ELISA de ratones transgénicos inmunizados con DKTP y análisis de secuencias de biblioteca de anticuerpos resultante.

Figura 17: Ejemplos de mutaciones somáticas y transposición de VDJ observada en ratones transgénicos inmunizados.

Figura 18: Resultados del ensayo de inmunotinción en la línea celular Tet-on transfectada con plásmido de respuesta que contiene anticuerpo A5.

Figura 19: Resultados de análisis de transferencia Western de sueros de líneas de ratón transgénico.

Figura 20: Fraccionamiento del tamaño de IgM humana mezclada con IgM monocatenaria humana producida por el sitio de IgM más IgG de ratones.

Figura 21: Resultados de análisis de ELISA de anticuerpos IgM y IgG monocatenarios producidos contra TNF α humano.

Figura 22: Muestra una estrategia para la generación de un plásmido de homodímero con afinidad de unión por HSP70 y α GAG.

Figura 23: Expresión funcional de complejo de homodímero de polipéptido en células CHO.

Figura 24: Demuestra unión funcional y simultánea de complejo de polipéptido homodímero a alfa α GAG y HSP70. Representación esquemática de un anticuerpo bivalente, bi-específico. Una segunda región variable (V_{HH2} dirigida contra gag) se clona sobre el extremo carboxi de un anticuerpo solo de cadena pesada que contiene la otra especificidad (V_{HH1} dirigido contra HSP70). La región bisagra entre C_{H3} y V_{HH2} se ha sustituido por una región de ligador en la que todas las cisteínas han sido sustituidas con prolina (flechas). Recubrir placa de ELISA con Gag, bloquear con 1% de leche/1% de BSA en PBS, incubar primero con medio de diacuero (1:2 dil.) y luego con lisado celular BI21 (contiene HSP70) (1:2 dil.). Eluir las proteínas unidas con tampón de muestra =2-mercaptoetanol y ejecutar sobre 8% de gel. Teñir con anticuerpos poli/monoclonales contra Gag, diacuero y HSP70. α Gag: policlonal de conejo /AP α -conejo de cerdo (azul). α HSP70: monoclonal/cabra una IgG humana-HRP (marrón). α Diacuero: IgG α -humana-HRP de cabra (marrón). Carril 1: Gag / Diacuero / lisado celular BI21. Carril 2: Gag / medio de cultivo (es control negativo de diacuero) / BI21. Carril 3: - leche-BSA / diacuero / BI21. Carril 4: - leche-BSA / medio de cultivo / BI21. Carril 5: Gag / diacuero / - leche-BSA. Carril 6: Gag / medio de cultivo / - leche-BSA

Figura 25: Muestra la estrategia para la generación de complejos de polipéptido de homodímero, opcionalmente en asociación con cadenas efectoras que llevan función efectora de IgA.

Figura 26: Muestra la estrategia para la generación de complejos de polipéptido de homodímero, opcionalmente en asociación con cadenas efectoras que llevan función efectora de IgA.

Técnicas generales

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas convencionales para procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase generalmente Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc.) y procedimientos químicos. Además, Harlow & Lane, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y., se refieren a técnicas inmunológicas convencionales.

Cualquier técnica de ADN recombinante adecuada puede usarse en la producción de los complejos de polipéptido bi- y multi-valente, anticuerpos de cadena pesada individuales y fragmentos de los mismos, de la presente invención y divulgación. Se construyen vectores de expresión típicos, tales como plásmidos, que comprenden secuencias de ADN que codifican cada una de las cadenas del complejo de polipéptido o anticuerpo. Puede usarse cualquier técnica establecida adecuada para fragmentación enzimática y química de inmunoglobulinas y separación de fragmentos resultantes.

La presente invención y divulgación también proporciona vectores que incluyen construcciones para la expresión de anticuerpos solo de cadena pesada en ratones transgénicos y la construcción y expresión de complejos de polipéptido de la presente invención.

Se apreciará que puede construirse un único vector que contiene las secuencias de ADN que codifican más de una cadena de polipéptidos. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican dos cadenas pesadas diferentes pueden insertarse en diferentes posiciones en el mismo plásmido.

Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica cada cadena de polipéptidos puede insertarse

individualmente en un plásmido, produciendo así varios plásmidos contruidos, codificando cada uno una cadena de polipéptidos particular. Preferentemente, los plásmidos en los que se insertan las secuencias son compatibles.

Cada plásmido se usa entonces para transformar una célula huésped de manera que cada célula huésped contenga secuencias de ADN que codifican cada una de las cadenas de polipéptidos en el complejo de polipéptido.

Vectores de expresión adecuados que pueden usarse para clonar en sistemas bacterianos incluyen plásmidos, tales como Col E1, pcR1, pBR322, pACYC 184 y RP4, ADN de fago o derivados de cualquiera de estos.

Para su uso en clonación en sistemas de levadura, vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos basados en un origen de 2 micrómetros.

Cualquier plásmido que contenga una secuencia promotora de genes de mamífero apropiada puede usarse en clonar en sistemas de mamífero. Pueden usarse secuencias promotoras de insecto o baculovirales para la expresión génica de células de insecto. Tales vectores incluyen plásmidos derivados de, por ejemplo, pBR322, virus del papiloma bovino, retrovirus, virus de ADN y virus de la variolovacuna.

Células huésped adecuadas que pueden usarse para la expresión del complejo de polipéptido o anticuerpo incluyen bacterias, levaduras y células eucariotas, tales como líneas celulares de insecto o de mamífero, plantas transgénicas, insectos, sistemas de expresión en mamífero y en otros invertebrados o vertebrados.

Complejos de polipéptido y anticuerpos de una única cadena pesada de la presente invención y divulgación

Se entenderá que el término 'complejo de polipéptido', 'un complejo de una única cadena pesada' y 'sitio de la cadena pesada heterólogo' de la presente invención también incluyen secuencias de polipéptidos y de ácidos nucleicos homólogos obtenidas de cualquier fuente, por ejemplo, homólogos celulares relacionados, homólogos de otras especies y variantes o derivados de los mismos.

Así, la presente invención y divulgación engloban variantes, homólogos o derivados de los complejos de polipéptido y anticuerpos como se describen en el presente documento.

En el contexto de la presente invención, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9% idéntica, preferentemente al menos el 98 o el 99% idéntica, al nivel de aminoácidos con respecto a al menos 30, preferentemente 50, 70, 90 ó 100 aminoácidos. Aunque también puede considerarse homología en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología en términos de identidad de secuencias.

La presente invención también incluye vectores de expresión contruidos y células huésped transformadas para su uso en producir los complejos de polipéptido y anticuerpos de la presente invención y divulgación.

Después de la expresión de las cadenas individuales en la misma célula huésped, pueden recuperarse para proporcionar el complejo de polipéptido completo o anticuerpo solo de cadena pesada en forma activa.

Se prevé que, en formas preferidas de la invención, las cadenas pesadas individuales sean procesadas por la célula huésped para formar el complejo de polipéptido completo o anticuerpo que ventajosamente es secretado del mismo. Preferentemente, la cadena efectora se produce por separado tanto por una célula huésped como por medios sintéticos.

Técnicas para la preparación de complejos de polipéptido de anticuerpo recombinante se describen en las referencias anteriores y también en, por ejemplo, los documentos EP-A-0 623 679; EP-A-0 368 684 y EP-A-0 436 597.

Inmunización de un organismo transgénico

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un procedimiento para la producción de los anticuerpos de la presente divulgación que comprende administrar un antígeno a un organismo transgénico de la presente divulgación.

Los anticuerpos y complejos de polipéptido producidos a partir de animales transgénicos de la presente divulgación incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de los mismos. Si se desean anticuerpos policlonales, el animal transgénico (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) puede inmunizarse con un antígeno y el suero del animal inmunizado recogerse y tratarse mediante procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales contiene anticuerpos para otros antígenos, los anticuerpos policlonales de interés pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad y técnicas semejantes que serán familiares para aquellos expertos en la materia. Las técnicas para producir y procesar antisueros policlonales también se conocen en la técnica.

Usos de los complejos de unión de polipéptido y anticuerpos de la presente invención y divulgación

Los complejos de polipéptido y anticuerpos que incluyen fragmentos de los mismos de la presente invención y divulgación pueden emplearse en: aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, aplicaciones de ensayo y reactivo *in vitro*, y similares.

Usos terapéuticos y profilácticos de los complejos de polipéptido y anticuerpos de la invención y divulgación implican la administración de lo anterior a un mamífero receptor, tal como un ser humano.

Se prefieren complejos de polipéptido sustancialmente puros y anticuerpos que incluyen fragmentos de los mismos de al menos el 90 al 95% de homogeneidad para administración a un mamífero, y del 98 al 99% o más homogeneidad es lo más preferido para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificado, parcialmente o a homogeneidad según se desee, los complejos de polipéptido y anticuerpos solo de cadena pesada como se describen en el presente documento pueden usarse diagnósticamente o terapéuticamente (incluyendo extracorpóreamente) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo usando procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia.

Generalmente, los complejos de polipéptido y anticuerpos de la presente invención y divulgación se utilizarán en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Normalmente, estos vehículos incluyen disoluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que pueden incluir solución salina y/o medios tamponados. Vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y Ringer con lactato. Adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si fuera necesario para mantener un complejo de polipéptido en suspensión, pueden elegirse de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

Vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y nutritivos y reforzadores de electrolitos tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición).

Los complejos de polipéptido y anticuerpos, que incluyen fragmentos de los mismos, de la presente invención y divulgación pueden usarse como composiciones administradas por separado o conjuntamente con otros agentes. Éstos pueden incluir diversos fármacos inmunoterapéuticos tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina, cisplatino o una inmunotoxina. Alternativamente, los complejos de polipéptido pueden usarse conjuntamente con enzimas para la conversión de pro-fármacos en su sitio de acción.

Composiciones farmacéuticas pueden incluir "mezclas" de diversos agentes citotóxicos u otros agentes conjuntamente con los anticuerpos seleccionados de la presente invención o incluso combinaciones de los anticuerpos seleccionados de la presente invención.

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de la invención puede ser cualquiera de aquellas comúnmente conocidas para aquellos expertos habituales en la materia. Para terapia, que incluye sin limitación inmunoterapia, los complejos de polipéptido o anticuerpos de la invención y divulgación pueden administrarse a cualquier paciente según técnicas convencionales. La administración puede ser por cualquier modo apropiado, que incluye parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, transdérmicamente, por la vía pulmonar, o también, apropiadamente, por infusión directa con un catéter. La dosificación y frecuencia de administración dependerá de la edad, sexo y afección del paciente, administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros a tener en cuenta por el profesional clínico.

Los complejos de polipéptido y anticuerpos de la presente invención y divulgación pueden liofilizarse para almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de uso. Pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas. Se apreciará por aquellos expertos en la materia que la liofilización y reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad funcional y que pueden tener que ajustarse los niveles de uso al alza para compensarlos.

Además, los complejos de polipéptido y anticuerpos de la presente invención y divulgación pueden usarse para fines de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos que se han descrito en el presente documento pueden generarse o producirse contra antígenos que se expresan específicamente durante estados de enfermedad o cuyos niveles cambian durante un estados de enfermedad dado.

Para ciertos fines, tales como fines de diagnóstico o de seguimiento, pueden añadirse marcas. Marcas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las siguientes: marcas radiactivas, marcas de espín de RMN y marcas fluorescentes. Los medios para la detección de las marcas serán familiares para aquellos expertos en la materia.

Las composiciones que contienen los complejos de polipéptido y anticuerpos de la presente invención y

divulgación o una mezcla de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

Una composición que contiene uno o más complejos de polipéptido o anticuerpos de la presente invención y divulgación puede utilizarse en ambientes profilácticos y terapéuticos para ayudar en la alteración, inactivación, destrucción o eliminación de una población de células diana seleccionada en un mamífero. Además, los repertorios seleccionados de complejos de polipéptido y anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse extracorpóreamente o selectivamente *in vitro* para destruir, mermar o eliminar eficazmente de otro modo una población de células diana de una colección heterogénea de células.

10 Ejemplo 1

En experimentos preliminares, ratones transgénicos se prepararon para expresar un sitio de la cadena pesada en el que dos exones V_{HH} de llama se ligaron a los segmentos de diversidad (D) y unión (J) de la cadena pesada humana, seguido de los genes de la región constante humana C_{μ} , C_{δ} , $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 3}$ y 3' LCR de inmunoglobulina de la cadena pesada humana. Los genes $C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$ humanos contuvieron una mutación de corte y empalme de G a A. La presencia del sitio Frt permitió la generación de un ratón transgénico de única copia de una matriz de transgenes de múltiples copias por recombinación mediada por Flp. Sin embargo, secuencias del sitio transgénico con una mutación de corte y empalme de G a A mostraron corte y empalme anómalo, pero eliminación de C_{H1} incompleta (Figura 9).

20 Construcciones

Para vencer este problema, una biblioteca de cósmidos genómica se cribó para clones que contenían los genes de V_H usando procedimientos convencionales. Una (o más) V_H de la línea germinal diferentes se eligieron al azar basándose en su secuencia (cinco clases de géneros en el caso de V_H humana). Se introdujeron codones de aminoácidos hidrófilos en las posiciones 42, 49, 50 y 52 según la numeración de IMGT (Lefranc y col. (1999)). Los genes de V_H se combinaron en un vector BAC mediante procedimientos convencionales tales como clonación directa usando ligadores preparados a medida o recombinación homóloga.

Se seleccionaron dos clones de la biblioteca de Pac genómica humana RPCI-11 (BACPAC Resource Center, EE.UU.): clon 1065 N8 que contiene segmentos D y J de la cadena pesada humana, C_{μ} (IgM) y C_{δ} (IgD) y clon 1115 N15 que contiene los genes $C_{\gamma 3}$ (IgG3). El clon de Bac 11771 de una biblioteca genómica humana diferente (Incyte Genomics, CA, EE.UU.) se usó como fuente del gen $C_{\gamma 2}$ (IgG2) y la LCR de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Mills y col. (1997) J. Exp Med., 15;186(6):845-58).

Usando técnicas convencionales, los genes $C_{\gamma 3}$ y $C_{\gamma 2}$ se subclonaron por separado en el vector pFastBac (Invitrogen). Similarmente, cualquiera de las otras regiones constantes de Ig puede clonarse a partir de estos BAC (IgA, IgE). Se logró una delección completa del exón C_{H1} por recombinación homóloga (Imam y col. (2001)) usando secuencias que flanquean el exón C_{H1} de cada región constante. Un sitio frt podría introducirse opcionalmente enfrente de la región de cambio de C_{μ} para permitir la generación de sitios de una única copia de sitios de múltiples copias mediante tratamiento con flp recombinasa *in vivo* por medios convencionales, por ejemplo, cruzando con ratones rosa-flp (Figura 10).

Los genes de V_H separados, segmentos D y J y exones C y LCR se clonaron en un BAC tanto por digestión por restricción convencional y ligaciones como por recombinación homóloga (o una mezcla de ambos) o cualquier otra técnica de clonación.

Entonces pudieron crearse más construcciones.

50 Sitio solo de IgM

Con el fin de obtener la construcción de IgM (Figura 11), uno o más genes de V_H (preferentemente genes de V_H humanos manipulados para proporcionar solubilidad o genes de V_{HH} de camélido), seguido de segmentos de la cadena pesada de D y J humana y C_{μ} , se clonaron en un BAC. Para la metodología véase anteriormente. En este caso, solo la región C_{μ} se clonó en el BAC final.

Sitio de IgM más IgG (C_{δ} es opcional)

Con el fin de obtener la construcción de IgM más IgG (Figura 12), uno o más genes de V_H (preferentemente segmentos de V_H humanos manipulados para proporcionar solubilidad o genes de V_{HH} de camélido), seguido de segmentos de la cadena pesada de D y J humana, C_{μ} (sin C_{H1} pero con el exón C_{H4}), (opcional C_{δ}) y los genes $C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$ humanos modificados y 3' LCR se clonaron en un BAC. Con el fin de generar un sitio de solo IgG, sitios loxP se introdujeron durante las etapas de clonación estándar (descritas anteriormente) y el BAC se cultiva en la cepa de *E. coli* 294 Cre (Buscholz y col.) y la recombinación mediada por cre da bacterias que producen un sitio de solo IgG. Para más detalles de la construcción véase anteriormente.

Sitio de IgM más IgG (C δ es opcional)

Con el fin de obtener la construcción de IgM más IgG (Figura 13), uno o más genes de V_H (preferentemente genes de V_H humanos manipulados para proporcionar solubilidad o genes de V_{HH} de camélido), seguido de segmentos de la cadena pesada de D y J humana, C μ (con C_{H1} y C_{H4}) (opcional C δ) y los genes C γ 2 y C γ 3 humanos modificados y 3' LCR se clonaron en un BAC. Con el fin de generar un sitio de solo IgG, sitios loxP se introdujeron durante las etapas de clonación estándar (descritas anteriormente) y el BAC se cultivó en la cepa de *E. coli* 294 Cre (Buscholz y col.) y la recombinación mediada por cre dio bacterias que producen un sitio de solo IgG.

Ratones transgénicos, cría y genotipado

El BAC final se introdujo en ratones transgénicos por microinyección convencional de óvulos fecundados o mediante tecnología de transfección embrionaria de citoblastos.

Se comprobaron sitios transgénicos para integridad y número de copias por análisis de transferencia Southern de ADN de cola (Southern 1975) usando sondas para sitios del extremo 5' y 3'. Los que resultaron positivos se criaron como líneas en el nivel inicial μ MT^{-/-}. El genotipado se hizo por análisis por PCR convencional usando cebadores para cada una de las regiones diferentes del sitio. El análisis de secuencias de los productos de RT-PCR derivados de ADNc de BM de ratones transgénicos en los que el exón C_{H1} entero de tanto C γ 2 como C γ 3 se había deletado (uno con (líneas HLL) y uno sin los genes C μ y C δ), mostró que los sitios transgénicos no solo son capaces de recombinación VDJ, sino que los transcritos de IgG se parecen a aquellos encontrados en HCAb de llama y camello.

Inmunohistoquímica

Los bazos se incorporaron en compuesto OCT. Secciones de criostato de 5 μ m congeladas se fijaron en acetona y se marcaron una o dos veces como se ha descrito previamente (Leenen y col. 1998). Se aplicaron anticuerpos monoclonales anti B220/RA3-6B2, anti-CD11c/N418 (Steinman y col., 1997), como sobrenadantes de cultivo de hibridomas. IgG anti-humana e IgM anti-humana de cabra acoplada a peroxidasa fueron de Sigma. Los reactivos de la segunda etapa fueron Ig anti-rata (DAKO, Glostrup, Dinamarca) o Ig anti-hámster (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) de cabra marcadas con peroxidasa e Ig anti-rata de cabra-fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, EE.UU.).

La Figura 15 muestra el análisis inmunohistoquímico de secciones de bazos congeladas de 5 μ m de ratones transgénicos μ MT^{-/-}, WT y HLL y HLL-MD en el nivel inicial μ MT^{-/-}. Se tiñeron secciones con anti-B220 (azul) para linfocitos B y anti-CD11c/N418 (marrón) para células dendríticas. Las flechas indican la localización de pequeñas agrupaciones de linfocitos B.

Análisis de citometría de flujo

Se prepararon suspensiones de una única célula a partir de órganos linfoides en PBS, como se ha descrito previamente (Sliker y col. 1993). Aproximadamente 1×10^5 células se incubaron con anticuerpos en PBS/ 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA) en placas de 96 pocillos durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces en PBS/0,5% de BSA. Para cada muestra, 3×10^4 eventos se puntuaron usando un analizador FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Los datos de FACS se analizaron usando el software informático CellQuest versión 1.0. Se realizó análisis de cuatro colores en un Becton Dickinson FACS Calibur. Se obtuvieron los siguientes mAb de BD Pharmingen (San Diego, CA): anti B220-RA3-6B2 conjugado con FITC, anti-CD19 conjugado con PE. Los datos de barrido de FACS de células del bazo teñidas con anti-CD19 y anti-B220 se muestran en el panel inferior de la Figura 15.

A la izquierda de la figura está una representación de la recombinación de Flp *in vivo* cruzando líneas HLL con una línea transgénica FlpeR y datos de barrido de FACS de apoyo de células del bazo de la recombinante, que muestran rescate de linfocitos B como se observa en las líneas HLL-MD originales directamente generadas. A la derecha está una representación de recombinación de Cre *in vivo* cruzando con la línea transgénica de Cre Cag y datos de FACS de células del bazo de la recombinante de una única copia.

Inmunización y producción de hibridomas (Figura 14)

Se crearon ratones transgénicos que contenían un sitio de anticuerpo solo de cadena pesada que consistía en dos dominios V_{HH} de llama, regiones D y J humanas e IgG2 y 3 regiones constantes (sin un dominio C_{H1}).

Ratones de 8 semanas de edad se inmunizaron con cualquier proteína 70 de choque térmico de *E. coli* (hsp70). Se inyectaron 20 μ g o 5 μ g de antígeno con adyuvante Specol (IDDLO, Lelystadt, NL) respectivamente s.c. en los días 0, 14, 28, 42 e i.p. en el día 50. La sangre se recogió en el día 0, 14 y 45. Después de tres refuerzos se

detectó un título bajo de anticuerpos específicos para antígeno en 1 de los 3 ratones HLL-MD inmunizados con Hsp70 (Figura 14).

Se realizó una fusión de células del bazo convencional con una línea de células de mieloma para generar un anticuerpo monoclonal que producía una línea celular de hibridoma monoclonal contra la proteína hsp70. El HCAB anti-HSP 70 consiste en el segmento de V_{HH} de llama más próximo a la región D (V_{HH2}) recombinada con el segmento IgHD3-10 humano (num. de acc. X13972) y el segmento IgHJ4-02 humano (num. de acc. X86355). Aunque no a alta frecuencia, los V_{HH} tienen algunas mutaciones que dan lugar a las alteraciones de aminoácidos observadas en la Figura 9A cuando se compara con la configuración de la línea germinal. El análisis de RT-PCR también mostró solo un transcrito de IgH productivo en el hibridoma, sugiriendo que no se han hecho otros transcritos. El anticuerpo IgG2 α HSP70 es secretado como dímero de solo cadena pesada (transferencias Western bajo condiciones de gel desnaturizante (dímero) y gel no desnaturizante (monómero) Fig. 14). Las células del bazo se fusionaron con células de mieloma Sp2-O-Ag14 (donación de R. Haperen) en el día 56 usando un kit ClonalCellTM-HY (StemCell Technologies, RU) según las instrucciones del fabricante.

Ratones transgénicos que contienen un sitio de anticuerpo solo de cadena pesada que consiste en dos dominios V_{HH} de llama, regiones D y J humanas, una IgM e IgG2 humana y 3 regiones constantes (todas sin un dominio C_{H1} , Figura 12) se inmunizaron con $TNF\alpha$ para obtener anticuerpos HC-IgM. Uno de los tres ratones mostró sueros positivos en ensayos de ELISA convencionales. Una fusión de mieloma convencional dio un hibridoma de IgM positivo (Figura 16). Después de la filtración en gel sobre Sepharose 6B bajo condiciones no reducidas, cada fracción de la columna se cargó a un gel bajo condiciones reductoras y se detectó por α -IgM humana-HRP (Figura 20). El fraccionamiento bajo condiciones no reductoras mostró que la HC-IgM es secretada como anticuerpo multímero con el mismo tamaño que una IgM de control humano (después de la resta del peso molecular de cadenas ligeras y el dominio C_{H1} que están ausentes de HC-IgM). El fraccionamiento del gel de cada fracción de columna bajo condiciones reductoras mostró el monómero esperado de (Fig. 20).

ELISA de Ig en suero

Sangre de ratones de 15-25 semanas de edad se recogió en tubos recubiertos con EDTA, se centrifugó durante 15' a temperatura ambiente (TA) y el sobrenadante se diluyó 1:5 en PBS. Una placa de 96 pocillos se recubrió durante 2 h con 5 mg/ml de una IgG anti-humana de cabra (YES Biotechnology) o una IgM anti-humana de cabra (Sigma), se lavó con PBS, se bloqueó durante 1 h a TA con disolución de bloqueo (1,5% de BSA/1,5% de leche en polvo/0,1% de Tween 20/PBS) y se lavó tres veces con PBS. Las series de dilución de muestras de suero y patrones (IgG2 humana o IgM humana (Sigma, Zwijndrecht, NL)) se cargaron y se incubaron durante 2-4 h y las placas se lavaron 6 veces con PBS antes de la adición de un anticuerpo secundario (IgG anti-humana de cabra diluida 1:2000 o IgM anti-humana de cabra acoplada a HRP (Sigma, Zwijndrecht, NL)). Todas las diluciones se hicieron en una disolución de bloqueo. Después de 1-2 h de incubación a TA y lavado en PBS se añadió sustrato POD (Roche).

El ELISA para la detección de sAb solubles específicos para antígeno de la biblioteca de fagos de IgG2 se muestra en la Figura 16. Se usaron sAb solubles como anticuerpos primarios sobre placas recubiertas de antígeno, seguido de anticuerpo α -myc de ratón y anticuerpo α -ratón de cabra conjugado con HRP. Se usó POD como sustrato. El panel inferior muestra huella genética de clones con enzima de restricción Hinf I, que muestra 5 insertos diferentes que codifican sAb contra *B. pertussis*.

Construcción y cribado de bibliotecas de anticuerpos

Se aisló ARN total de bazos de ratones solo de IgG de una única copia inmunizados con DKTP (Figura 12 después de tratamiento con cre) usando un sistema de aislamiento de ARN Ultraspec (Biotecx Laboratories Inc, Houston, Texas, EE.UU.). Se preparó ADNc usando oligo dT. Fragmentos de ADN que codifican fragmentos de VHHDJ se amplificaron por PCR usando cebadores específicos: cebador vh1 back Sfi I (Dekker y col. 2003) en combinación con el cebador hIgG2hingrev (5'-AATCTGGGCAGCGCCGCTCGACACAACATTTGCGCTC-3'). Los VHHDJ amplificados (- 400 pb) se digirieron con Sfi I / Not I, se purificaron en gel y se clonaron en vector de fagémido digerido con Sfi I / NotI pHEN-1.

La transformación en células electro-competentes TG1 dio biblioteca de anticuerpos de un único dominio humano. Se realizaron dos rondas de selección usando inmunopurificación sobre antígenos de vacuna adsorbidos sobre plástico (inmunotubos recubiertos con vacuna sin diluir). El análisis y la secuenciación de restricción fueron convencionales.

RT-PCR de sitio solo de la cadena pesada

Entonces se investigó si el sitio HLL-MD funciona o no como sitio normal en la producción de un diverso repertorio de anticuerpos secuenciando los productos de RT-PCR obtenidos usando cebadores específicos de IgG2 e IgG3 sobre ADNc de parches de Peyer. La Figura 17 muestra algunos ejemplos de mutaciones somáticas de clones de ratones no inmunizados (panel izquierdo) y ratones inmunizados (panel derecho). Los ratones fueron sitios

solo de IgG, hsp70 de *E. coli* inmunizada, lisado de *Pertussis*, toxoide tetánico. En sombra gris está la región bisagra de IgG2 que empieza con ERKCCV

5 Aunque, el análisis por RT-PCR sobre parches de Peyer mostró que se usan ambos V_H , todos los anticuerpos secuenciados reorganizaron V_H2 . La fuente de variabilidad del repertorio es la región CDR3 formada por la selección de segmentos D y J y por las uniones V-D y D-J. El uso de segmentos J humanos es similar al observado en transposiciones humanas, usándose casi siempre los segmentos JH4 y JH6 .

10 Este análisis mostró que ambas V_H , diferentes segmentos de D humanos y todos los de J humanos se usan, para contribuir a un diverso repertorio de anticuerpos. También mostró la presencia de linfocitos B cambiados a IgG3 y la aparición de mutaciones somáticas por comparación de cada gen reorganizado con su línea germinal homóloga, es decir, el V_H original en la construcción transgénica (véase la Figura 17). Por tanto, el receptor de antígeno IgG solo de cadena pesada humana puede proporcionar las señales necesarias para la maduración de linfocitos B.

15 **Inmunotinción**

La Figura 18 muestra los resultados de inmunotinción de una línea celular Tet-on adicionalmente transfectada con el plásmido de respuesta que contiene anticuerpo A5 (Dekker y col. 2003). El panel superior muestra producción inducida por doxiciclina de anticuerpo A5 (rojo) en citoplasma y tinción nuclear de las células con DAPI (azul). El panel inferior muestra que células que expresan rTA en el núcleo son las que producen A5 tras la inducción (panel superior). La tinción se hizo con uno de HCAb humano contra rTA (verde) con la secuencia mostrada a continuación. La IgG anti-humana de cabra conjugada con FITC se usó como etapa secundaria. A5 se detectó como se describe previamente por Dekker y col. 2003. El anticuerpo rTA fue una IgG3 con la siguiente secuencia:

25 241 AGACTCT
 80 R L
 301 CCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTC
 30 100 S C A A S G S I F S I N A M G W Y R Q A
 361 CAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCCGAGCTATTACTAGTGGTGGTAGCACAAGGTATGCAG
 35 120 P G K Q R E L V A A I T S G G S T R Y A
 421 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGC
 140 D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L
 40 481 AAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTTGATCTCTATGGTTC
 160 Q M N S L K P E D T A V Y Y C L I S M V
 541 GGGGAGCCCGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGAGCTCA
 45 180 R G A R F D Y W G Q G T L V T V S S E L
 601 AAACCCCACTT
 200 K T P L

50 La bisagra IgG3 empieza en el aminoácido 198 ELKTPL. Para comparación véase la región bisagra de IgG2 en la Figura 17.

Análisis de transferencia Western

55 La Figura 19 muestra transferencias Western de sueros de diferentes líneas de ratón transgénico que contienen el sitio IgM más IgG (Figura 10) después de tratamiento con cre (es decir, IgM delecionado, solo queda IgG). Se purificaron sueros por prot G y se fraccionaron en gel bajo condiciones reductoras (Figura 19, panel derecho) y no reductoras (Figura 19, panel izquierdo). Los controles fueron los ratones KO de referencia y una muestra de suero humano normal. Obsérvese la diferencia de tamaño entre los dos geles que muestran que IgG solo de cadena pesada humana es un dímero.

La señal mostrada en la Figura 19 se detectó con un anticuerpo dirigido contra IgG humana mediante procedimientos convencionales.

65

Fraccionamiento por tamaño de IgM humana producida por el sitio de IgM más IgG de ratón

El suero de los ratones IgM más IgG (Figura 13) se fraccionó por filtración en gel bajo condiciones no reductoras después de mezclar con una muestra de suero humano como control. Los resultados se muestran en la Figura 20. Los pesos moleculares de los complejos sobre la columna disminuyen con cada carril (que representan cada fracción) de izquierda a derecha. Las fracciones (cada carril) se analizaron por electroforesis en gel bajo condiciones reductoras.

Se realizaron análisis de ELISA en varios hibridomas preparados a partir de ratones que contienen el sitio de IgM más IgG (Figura 13) inmunizado con TNF α humano. Los resultados se muestran en la Figura 21. Las dos filas superiores en la Figura 21 se analizaron con una IgG anti-humana, las dos siguientes filas con una IgM anti-humana. Las muestras de suero (flechas) muestran que el ratón ha generado anticuerpos anti-TNF α tanto IgG como IgM. La flecha sencilla muestra un hibridoma positivo de IgM. Los pocillos se recubrieron con TNF α humano comercialmente disponible. Todos los procedimientos fueron convencionales.

Ejemplo 2

El anticuerpo bi-valente bi-específico se generó combinando dos anticuerpos mono-específicos solo de cadena pesada. El primer anticuerpo forma el esqueleto que lleva la primera especificidad y las funciones efectoras (región variable y región constante, respectivamente). Éste se combinó con el segundo anticuerpo con la segunda especificidad mediante una bisagra recientemente diseñada. Esta bisagra fue similar a la secuencia bisagra de IgG2 existente, pero se alteró reemplazando las cisteínas con prolinas para prevenir la reticulación de las cisteínas en el dímero de anticuerpo y proporcionar flexibilidad adicional mediante las prolinas para prevenir que el segundo anticuerpo se limitara espacialmente, que de otro modo puede haber inhibido su función.

El anticuerpo de esqueleto de partida fue un anticuerpo producido contra la proteína HSP70 de *E. coli*. El antígeno de HSP70 se inyectó en ratones transgénicos que contenían un sitio de anticuerpo solo de cadena pesada como se describe en (véase anteriormente la Fig. 14). Un anticuerpo monoclonal se produjo a partir de estos animales por tecnología de fusión de hibridomas convencional (véase anteriormente). El ADNc que codifica el anticuerpo para α HSP se clonó posteriormente por procedimientos de ADN recombinante de RT-PCR convencionales produciendo un plásmido que contiene un ADNc de longitud completa que incluyó del extremo 5' al extremo 3' (en la proteína del extremo N al extremo COOH) el codón de iniciación ATG, la secuencia de péptidos señal, el dominio variable V_{HH}1 (véase Janssens y col.), la región D y J recombinada y la región constante de C γ 2 (que carece de una región C_H1), pero que incluyó el codón de terminación y el sitio de poliA (Figura 22, panel superior). El ADNc que codifica el anticuerpo α HSP70 se amplificó por PCR para clonar usando un cebador directo y un cebador inverso.

El cebador directo fue: CTGGAATTCTCAACCATGGAGCTGGGGCTGAGC proporcionando un sitio EcoRI para fines de clonación (subrayado) una secuencia de iniciación de la traducción eficaz (**negrita**) y el codón de iniciación normal (sombra gris).

El cebador inverso fue: GACAAGCTTTACCCGAGACAGGGAGAGGC proporcionando un sitio de clonación HindIII (subrayado) y quedando el codón de terminación normal.

Por tanto, la amplificación conduce a un fragmento de EcoRI/HindIII que contiene un sitio EcoRI (subrayado), una secuencia de iniciación de la traducción eficaz (**negrita**) y el codón de iniciación normal del gen del anticuerpo α HSP (sombra gris, véase también la Figura 22).

El cebador del extremo 3' inverso fue: GACAAGCTTTACCCGAGACAGGGAGAGGC proporcionando un sitio de clonación HindIII (subrayado) y eliminando el codón de terminación normal. Esto produjo un fragmento (Figura 22, segundo a la izquierda desde la parte superior) con un sitio EcoRI para clonar sobre una secuencia promotora y un sitio HindIII para clonar el extremo 5' sobre el plásmido de expresión y el extremo 3' sobre una secuencia bisagra novedosa (véase más adelante). Finalmente, el fragmento se cortó con EcoRI y HindIII proporcionando extremos monocatenarios apropiados para la clonación.

El segundo anticuerpo clonado que trae la segunda especificidad comprendió el dominio V_{HH} de un anticuerpo de llama contra el antígeno gag de retrovirus de cerdo (PERV) (Dekker y col., (2003) J Virol., 77 (22): 12132-9, Fig. 22, arriba a la derecha). α gag se amplificó mediante amplificación por PCR convencional usando los siguientes cebadores:

Directo: GTCCTCGAGGCCAGGTCCAACTGCAGGAGTCTG y el cebador inverso GTCGAATTCTCATTCCGAGGAGACGGTGACCTGGGTC. Esto proporciona el fragmento amplificado (Figura 22, segundo a la derecha desde arriba) con un sitio XhoI (sombra gris) para clonar el extremo 5' en marco con la novedosa bisagra (véase abajo) y un sitio EcoRI (subrayado) para clonar el extremo 3' en el plásmido de expresión (Figura 22, centro derecha). Finalmente, el fragmento se cortó con EcoRI y XhoI para generar

extremos monocatenarios para la clonación.

Las dos secuencias de anticuerpos se combinaron en una secuencia de diacuerpo mediante la novedosa bisagra. La novedosa bisagra se generó a partir de dos oligonucleótidos que juntos forman un oligonucleótido bicatenario con nucleótidos protuberantes de 5' y 3' (respectivamente compatibles con HindIII y XhoI) para fines de clonación. Se diseñó para estar en marco con el extremo de la secuencia de α HSP70 y el inicio de la secuencia de α gag. La formación de los puentes disulfuro normalmente presentes en la bisagra de IgG2 humana se previno reemplazando las cisteínas (sombra gris) con prolinas (subrayadas). Las prolinas añaden flexibilidad adicional a la bisagra para permitir el funcionamiento apropiado del segundo dominio de anticuerpo que se conecta con el extremo COOH del primer anticuerpo mediante la bisagra.

La secuencia bisagra de IgG normal (codones de cisteína en sombra gris, codones de prolina subrayados) GAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCCA y su complemento se sustituyeron con AGCTTCTGAGCGCAAACCACCAGTCGAGCCACCACCGCCACCAC y su complemento TCGAGTGGTGGCGGTGGCTCGACTGGTGGTTGCGCTCAGA). Esto también proveyó el fragmento (recuadro blanco bisagra, Figura 22, centro) de dos extremos monocatenarios compatibles con sitios HindIII (negrita) y XhoI (cursiva) para fines de clonación.

Los tres fragmentos (α HSP70 IgG2, bisagra y α gag) se ligaron posteriormente en un plásmido de expresión bluescript (Pbluescript1 1 sk+) que contenía un promotor de actina de pollo y una secuencia potenciadora del CMV (Figura 22, plásmido de expresión) por tecnología de ADN recombinante convencional. Cuando este plásmido se expresa (véase más adelante), produce el diacuerpo mostrado en la parte inferior de la Figura 22.

El plásmido de expresión de diacuerpo se cultivó y se cotransfectó con el plásmido pGK-higro (para permitir la selección de células transfectadas) mediante procedimientos convencionales (Superfect) en células CHO (Figura 23). Se seleccionaron clones positivos en higromicina que contenían medio y se identificaron positivamente como que expresaban el diacuerpo realizando un ELISA de α gag convencional (Dekker y col., J. Virol. 2003) del medio de crecimiento que contenía diacuerpo secretado por las células CHO usando una detección de α -IgG humana-HRP. Probar positivamente para la actividad de α -gag hace lo más probablemente que un clon dado exprese el diacuerpo entero, debido a que la especificidad de gag está en el extremo trasero (extremo de COOH) del diacuerpo. Un ELISA posterior para HSP70 también fue positivo. Las transferencias Western de estos clones seleccionados por ELISA bajo condiciones no reductoras y reductoras se realizaron con el fin de mostrar que la proteína expresada a partir del plásmido era un dímero de 110 kD (como se muestra en la parte inferior de la Figura 23), en comparación con el monómero de 55 kD (condiciones no reductoras y reductoras y transferencias Western, Figura 23, derecha). Así, el ELISA y la transferencia Western muestran juntos que el diacuerpo se expresa y se secreta en el medio como un dímero por las células CHO transfectadas ($a > 70$ ng/ml) y que el anticuerpo puede unirse a HSP70 y antígenos gag. Sin embargo, no muestra que la misma molécula de diacuerpo de dímero pueda unirse a ambos antígenos al mismo tiempo.

Por tanto, se llevó a cabo un experimento de seguimiento. Primero, el antígeno gag se fijó al fondo de un pocillo de plástico (primer pocillo de la Figura 24, centro). El diacuerpo (Figura 24, arriba) se capturó posteriormente por el primer antígeno (gag) después de la aplicación del sobrenadante de CHO de células del clon 1 (segundo pocillo de la Figura 24, centro). Esto fue seguido de amplio lavado y luego aplicación del segundo antígeno (HSP 70, Figura 24, tercer pocillo del centro), seguido de nuevo de amplio lavado. Si una molécula de diacuerpo pudiera unirse a ambos antígenos al mismo tiempo, debería capturarse al fondo del pocillo uniendo el primer antígeno (gag) y luego capturar el segundo antígeno (HSP70). Cuando el complejo entero se eluyó posteriormente del pocillo (Figura 24, centro, pocillo derecho), tanto el diacuerpo como los antígenos fueron visibles en una transferencia Western (Figura 24, abajo).

Con el fin de recoger el diacuerpo secretado, los clones de CHO se cultivaron bajo las mismas condiciones convencionales y en medios (medio SIGMA de hibridoma, libre de suero) usados para la recogida de anticuerpos de hibridomas.

Procedimientos: Pocillos de una placa Nunc-Immuno (Maxisorp) se recubrieron con proteína gag recombinante purificada (12,5 μ g/ul en PBS) durante la noche a 4 °C. Se bloquearon durante dos horas con 1% de leche/ 1% de BSA en PBS. El medio del clon 1 de CHO-DB diluido 1/2 en PBS-leche-BSA (o controles) se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente (TA). Lisado celular B121 bacteriano (que contiene proteína HSP70) diluido 1/2 en PBS-leche-BSA se incubó durante 3 h a TA y se lavó. Las proteínas unidas se eluyeron con tampón de muestra de Laemmli que contenía 2-mercaptoetanol. Las muestras se analizaron por transferencia Western y luego se ejecutaron sobre 10% de SDS-PAGE y se transfirieron sobre membrana de nitrocelulosa. La transferencia se bloqueó durante dos horas con PBS-leche-BSA y se incubó con anticuerpos primarios. Los productos se visualizaron mediante procedimientos convencionales usando anticuerpos secundarios acoplados a enzimas que permiten tinción visual. Los reactivos usados fueron:

α Gag: policlonal de conejo (1:2000) 2 h a TA

ES 2 440 990 T3

α Diacuerpo: IgG α -humana de cabra-HRP (1:2500) 2 h a TA
 α HSP70: medio G20-380 monoclonal (1:2) 2 h a TA.

5 Los anticuerpos secundarios fueron: AP α -conejo de cabra (1:2000) 2 h a TA y IgG α -humana de cabra-HRP (1:2500) 2 h a TA contra HSP70 monoclonal.

Para visualizar las bandas de proteína se usó primero hacer reaccionar sustrato NBT/BCIP (púrpura) con fosfatasa alcalina (AP) y segundo hacer reaccionar sustrato DAB (marrón) con peroxidasa de rábano picante (HRP).

10 Todas las etapas de lavado se hicieron con PBS-0,05% de Tween-20.

15 Los controles se llevaron a cabo dejando fuera uno de los componentes o añadiendo medio de células CHO que no produce diacuerpos (Figura 24), es decir, que no carece de aplicación de diacuerpo (medio de células CO no transfectadas) y, por tanto, solo tiene gag (carril 2); que carece de gag en el fondo del pocillo (sustituido con proteína de la leche) y, por tanto, no debe tener ninguno de los productos (carril 3); que carece de gag y diacuerpo y no debe tener ninguno de los productos (carril 4); que carece de antígeno de HSP70 (sustituido con antígeno de la leche) y, por tanto, solo debe tener el diacuerpo y gag (carril 5); que carece de HSP70 y diacuerpo y solo debe tener gag (carril 6).

20 El hecho de que los tres componentes (el diacuerpo más ambos antígenos) estuvieran solo presentes en el pocillo del carril 1 que recibió los tres componentes (véase también la leyenda debajo de la Figura 24) muestra que el diacuerpo individual se une a ambos antígenos al mismo tiempo.

25 Generación de IgA biespecífico o IgM multi-específica

La generación de IgA biespecífico es esencialmente como se ha descrito para IgG (anteriormente), pero usando además de V_Hsol, D y J, la región constante C α que conduce a la generación de IgA (Figura 25).

30 La generación de IgM es esencialmente similar, pero ofrece una posibilidad adicional debido a que moléculas de IgM pueden formar grandes multímeros (con o sin cadenas J). Así, además de moléculas similares a aquellas descritas anteriormente (Figura 26, abajo derecha, después de la eliminación de las secuencias de multimerización), también pueden generarse multímeros simplemente co-expresando IgM con diferentes especificidades (Figura 26, abajo izquierda).

35 Ejemplo comparativo 3

Un vector de expresión que codifica un complejo de polipéptido que comprende: una cadena pesada que incluye un dominio de unión que se une a PSCA (antígeno de citoblasto de la próstata), un dominio de ensamblaje que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Jun y bisagra de anticuerpo, dominios C_H2 y C_H3; y una cadena ligera que incluye un dominio de ensamblaje complementario que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Fos se construye usando técnicas de biología molecular como se describen en Sambrook y col. ((1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

45 El vector de expresión se transfiere entonces a una célula huésped adecuada por técnicas convencionales para producir una célula huésped transfectada para expresión optimizada del vector. La célula huésped transfectada o transformada se cultiva entonces usando cualquier técnica conocida adecuada para estos expertos en la materia para producir el complejo de polipéptido de la invención.

50 Una vez producidos, los complejos de polipéptido se purifican mediante procedimientos convencionales de la materia, que incluyen filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad (por ejemplo, proteína A).

El dominio efector soluble que consiste en 3,3'-diindolilmetano (DIM) se fusiona entonces con el dominio de ensamblaje complementario usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia.

55 Ejemplo 4

60 Un vector de expresión que codifica la cadena pesada del complejo de polipéptido de la presente invención que comprende; un dominio de unión de V_{HH} soluble que se une a AFP (alfa-fetoproteína) y un dominio de ensamblaje que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Jun, y bisagra de anticuerpo, dominios C_H2 y C_H3 se construye usando técnicas de biología molecular como se describe en Sambrook y col.

65 Un segundo vector de expresión que codifica la cadena ligera del complejo de polipéptido de la presente invención también se construye. Éste comprende un dominio de ensamblaje complementario que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Fos.

Los vectores de expresión se transfieren entonces a una célula huésped adecuada por técnicas convencionales para producir una célula huésped co-transfectada para expresión optimizada del vector. La célula huésped transfectada o transformada se cultiva entonces usando cualquier técnica adecuada conocida para estos expertos en la materia para producir el complejo de polipéptido de la invención.

Una vez producidos, los complejos de polipéptido se purifican mediante procedimientos convencionales de la materia, que incluyen filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad (por ejemplo, proteína A).

El dominio efector soluble que consiste en 3,3'-diindolilmetano (DIM) se fusiona entonces con el dominio de ensamblaje complementario usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia.

Ejemplo comparativo 5

VCAM y VLA-4

Un vector de expresión que codifica un complejo de polipéptido que comprende: una cadena pesada que incluye un dominio de unión que se une a PSCA (antígeno de citoblasto de la próstata), un dominio de ensamblaje que consiste en VCAM y bisagra de anticuerpo, dominios C_{H2} y C_{H3}; y una cadena ligera que incluye un dominio de ensamblaje complementario que consiste en VLA-4 fusionado con toxina de ricina A se construye usando técnicas de biología molecular como se describen en Sambrook y col.

El vector de expresión se transfiere entonces a una célula huésped adecuada por técnicas convencionales para producir una célula huésped transfectada para expresión optimizada del vector. La célula huésped transfectada o transformada se cultiva entonces usando cualquier técnica adecuada conocida para estos expertos en la materia para producir el complejo de polipéptido de la invención.

Una vez producidos, los complejos de polipéptido se purifican mediante procedimientos convencionales de la materia, que incluyen filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad (por ejemplo, proteína A).

Ejemplo 6

Un vector de expresión que codifica un complejo de polipéptido que comprende: una cadena pesada que incluye un dominio de unión que se une a PSCA (antígeno de citoblasto de la próstata), un dominio de ensamblaje que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Jun y bisagra de anticuerpo, dominios CH₂ y CH₃; y una cadena ligera que incluye un dominio de ensamblaje complementario que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Fos y un dominio efector soluble que codifica purina nucleósido fosforilasa (PNP) se construye usando técnicas de biología molecular como se describen en Sambrook y col.

El vector de expresión se transfiere entonces a una célula huésped adecuada por técnicas convencionales para producir una célula huésped transfectada para expresión optimizada del vector. La célula huésped transfectada o transformada se cultiva entonces usando cualquier técnica adecuada conocida para estos expertos en la materia para producir el complejo de polipéptido de la invención.

Una vez producidos, los complejos de polipéptido se purifican mediante procedimientos convencionales de la materia, que incluyen filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad (por ejemplo, proteína A).

PNP convierte fludarabina en el metabolito tóxico 2-fluoroadenina que destruye las células que comprenden la enzima PNP y además se difunde para destruir células sin infectar de alrededor, un efecto espectador local.

Ejemplo 7

Un vector de expresión que codifica una primera cadena pesada del complejo de polipéptido de la presente invención que comprende; un dominio de unión V_{HH} soluble que se une a la región V3-PND de antígeno de glucoproteína gp120 y un dominio de ensamblaje que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Jun y bisagra de anticuerpo, dominios C_{H2} y C_{H3} se construye usando técnicas de biología molecular como se describen en Sambrook y col.

También se construye un segundo vector de expresión que codifica una segunda cadena pesada del complejo de polipéptido de la presente invención que comprende: un dominio de unión V_{HH} soluble que se une a GP-41, un dominio de ensamblaje que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Jun y bisagra de anticuerpo, dominios C_{H2} y C_{H3}.

También se construye un tercer vector de expresión que codifica la cadena ligera del complejo de polipéptido

de la presente invención. Éste comprende un dominio de ensamblaje complementario que consiste en el motivo de cremallera de leucina de Fos.

5 Los vectores de expresión se transfieren entonces a una célula huésped adecuada por técnicas convencionales para producir una célula huésped co-transfectada para expresión optimizada del vector. La célula huésped transfectada o transformada se cultiva entonces usando cualquier técnica adecuada conocida para estos expertos en la materia para producir el complejo de polipéptido de la invención.

10 Una vez producidos, los complejos de polipéptido se purifican mediante procedimientos convencionales de la materia, que incluyen filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad (por ejemplo, proteína A).

15 El dominio efector soluble que consiste en el inmunogén del péptido HN-1 MN V3 (PND) se fusiona entonces con el dominio de ensamblaje complementario usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia.

Ejemplo 8

20 Un vector de expresión que codifica una primera cadena pesada del complejo de polipéptido de la presente invención que comprende: un dominio de unión V_{HH} soluble que se une a la región V3-PND de antígeno de glucoproteína se construyó usando técnicas de biología molecular como se describen en Sambrook y col. ((1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

25 También se construye un segundo vector de expresión que codifica una segunda cadena pesada del complejo de polipéptido de la presente invención que comprende: un dominio de unión V_{HH} soluble que se une a GP-41.

Las dos cadenas pesadas se caracterizan porque las regiones constantes para las dos cadenas pesadas comprenden dominios μ , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} idénticos.

30 Los vectores de expresión se transfieren entonces a célula huésped que expresa constitutivamente una cadena J por técnicas convencionales para producir una célula huésped co-transfectada para expresión optimizada del vector. La célula huésped transfectada o transformada se cultiva entonces usando cualquier técnica adecuada conocida para estos expertos en la materia para producir el complejo de polipéptido de la invención.

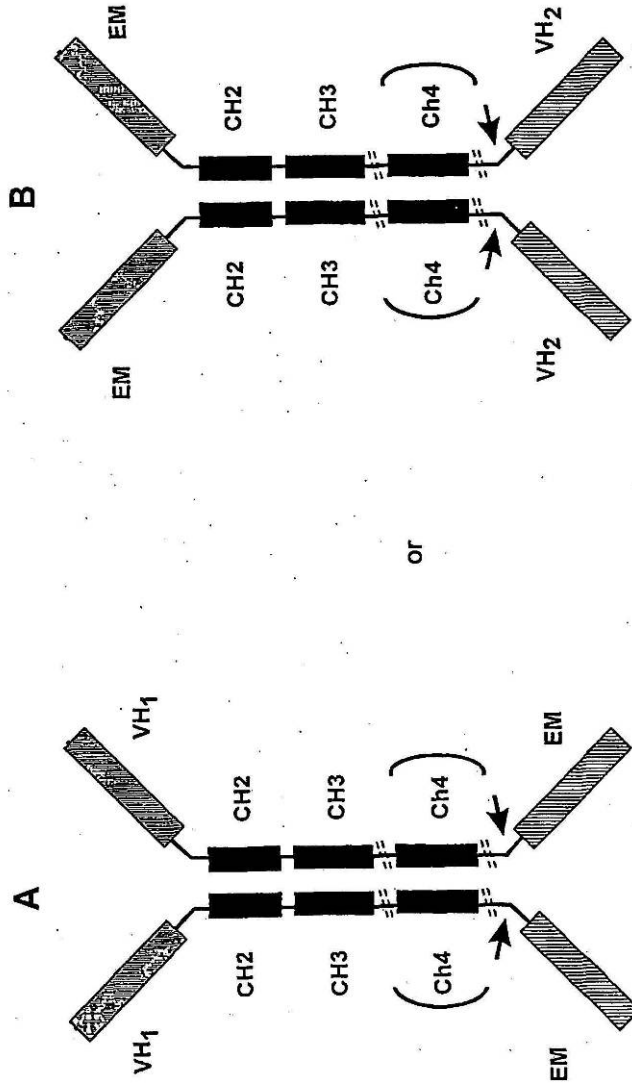
35 Una vez producidos, los complejos de polipéptido se purifican mediante procedimientos convencionales de la materia, que incluyen filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad (por ejemplo, proteína A).

40 El dominio efector soluble que consiste en el inmunogén del péptido MN V3 (PND) del VIH-1 se fusiona entonces con el dominio de ensamblaje complementario usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia.

REIVINDICACIONES

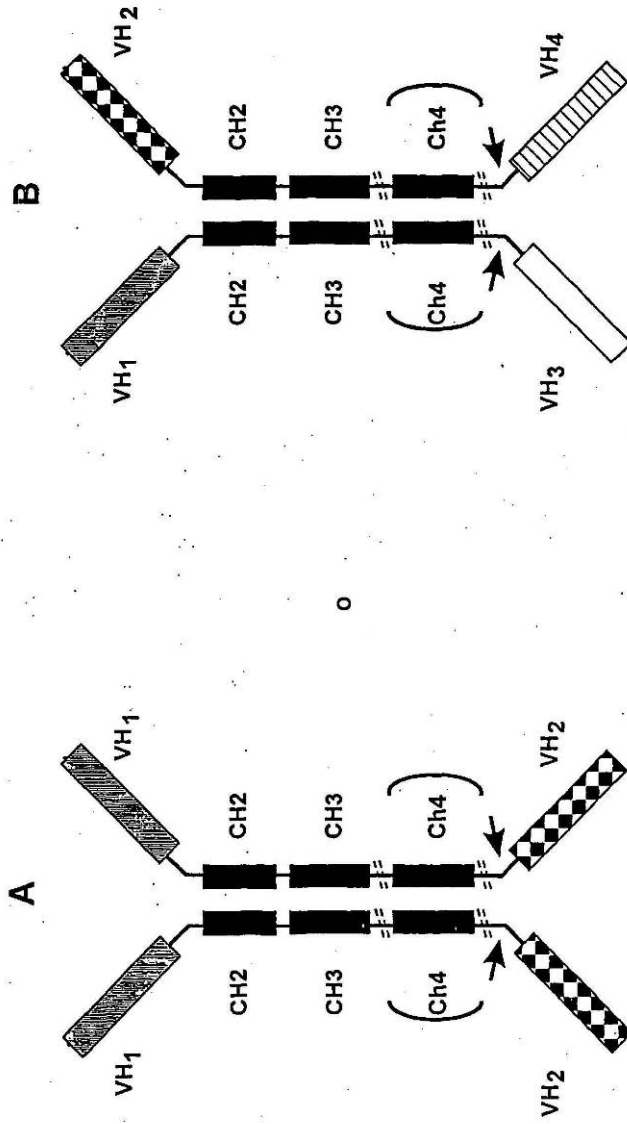
- 5 1. Un complejo de polipéptido de unión que consiste en un dímero de una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada en el que:
cada cadena pesada comprende dos dominios de unión V_H ligados por un dominio de dimerización; y cada dominio de dimerización comprende al menos dominios constantes de anticuerpos de cadena C_{H2} , C_{H3} y opcionalmente C_{H4} de cualquier clase de gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina.
- 10 2. Un complejo de polipéptido de unión de la reivindicación 1, en el que los dominios de unión V_H presentes en los extremos amino de la primera y segunda cadena pesada son idénticos, y los dominios de unión V_H presentes en los extremos carboxilo de la primera y segunda cadenas pesadas son idénticos.
- 15 3. Un complejo de polipéptido de unión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los dominios de unión V_H pueden derivarse de dominios de unión V_H naturales que incluyen dominios de unión V_{HH} de camélido, o dominios de unión V_H modificados de cualquier vertebrado.
- 20 4. El complejo de polipéptido de unión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los dominios V_H son dominios V_H humanos.
- 25 5. Un polinucleótido aislado que codifica ambas cadenas pesadas de un complejo de unión de polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector de clonación o de expresión que contiene polinucleótido aislado de la reivindicación 5 que codifica la primera y segunda cadenas pesadas.
7. Una célula huésped transformada con un vector de expresión de la reivindicación 6.
- 30 8. Un procedimiento para la producción de un complejo de polipéptido de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 7 y aislar el complejo de polipéptido de unión.
- 35 9. Una composición del complejo de polipéptido de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacológicamente apropiado.
- 40 10. El complejo de polipéptido de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición de la reivindicación 9, para su uso en terapia.
11. El complejo de polipéptido de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en diagnosticar una enfermedad.

FIG. 1



Mas variaciones de A y B

FIG. 2



Mas variaciones de los ejemplo mostrados en A y B

FIG. 3

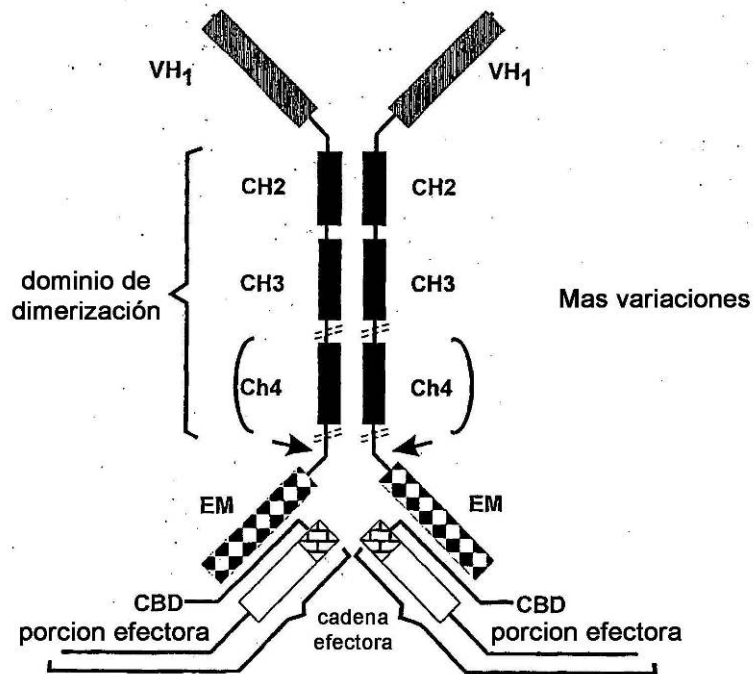


FIG. 4

IgA Secretora bivalente

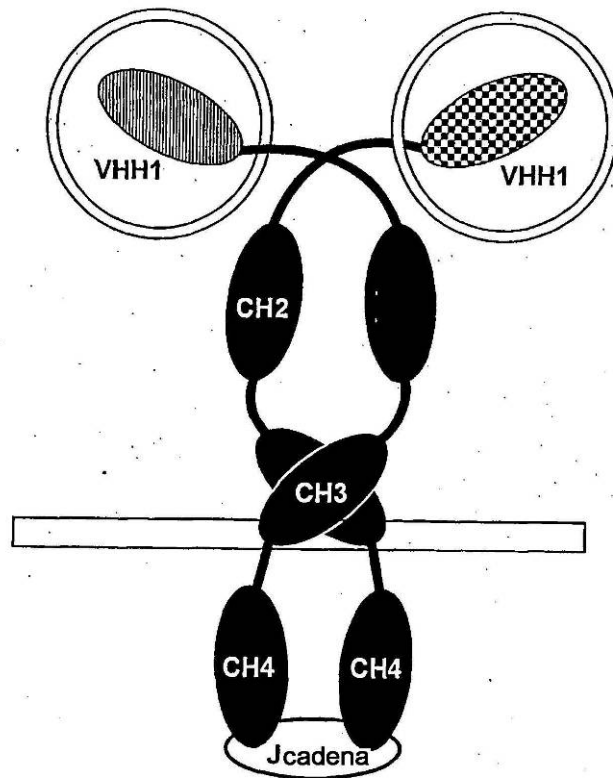


FIG. 5
IgM Multivalente

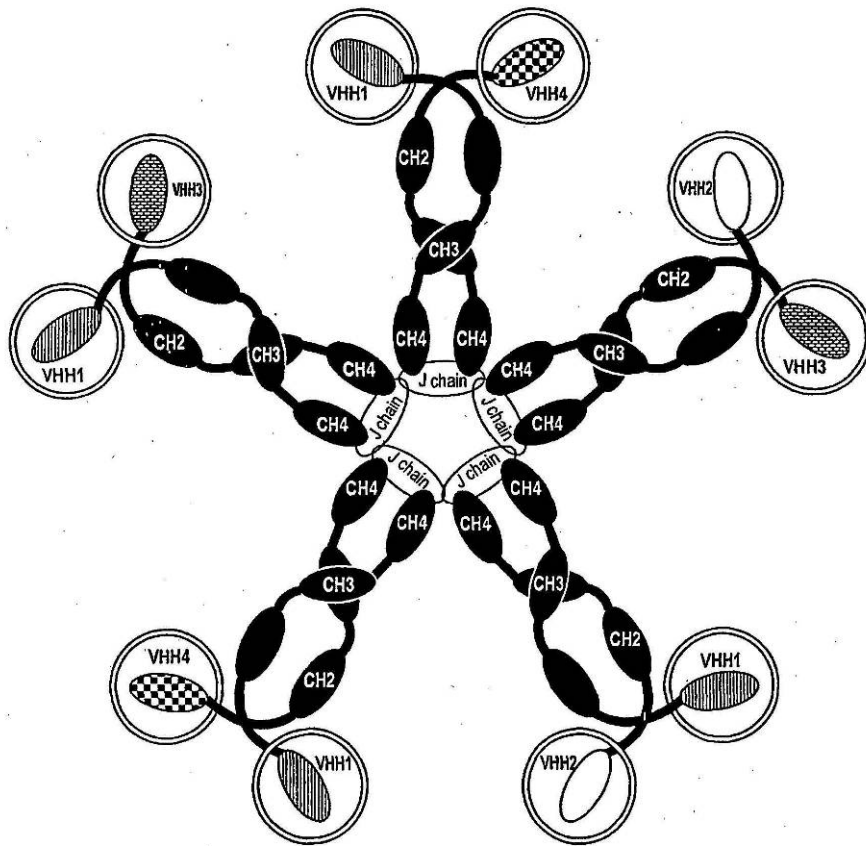
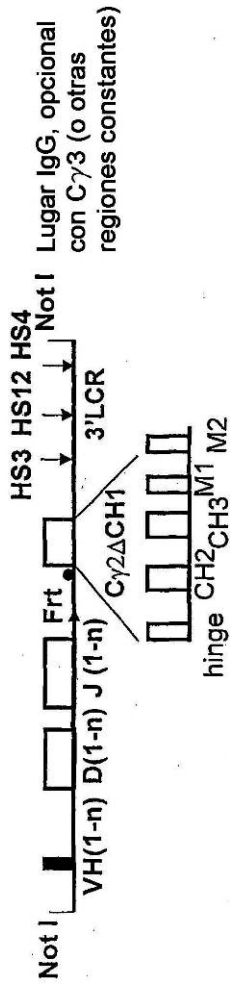


FIG. 6

Generación de la cadena pesada solo IgG



Generar ratones transgénicos en ratones con un locus de la cadena pesada defectiva (e.g. μ MT)

inmunizar con antígenos

generar hibridomas

opcional

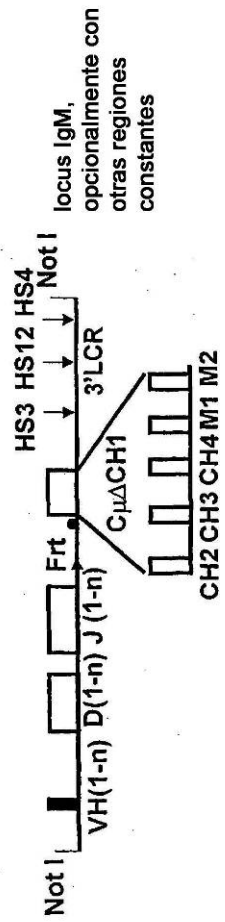
clonar anticuerpos en expresiones plasmidas

generar bibliotecas de presentación de fagos

aislar clones individuales

FIG. 7

Generación de cadena pesada solo IgM



generar ratones transgénicos en ratones con un locu en la cadena pesada defectiva (e.g. μ MT)

inmunizar con antígenos

generar hibridomas

opcional

clonar anticuerpos en expresiones plasmidias

generar bibliotecas de presentación de fagos

Aislar clones individuales

FIG. 8

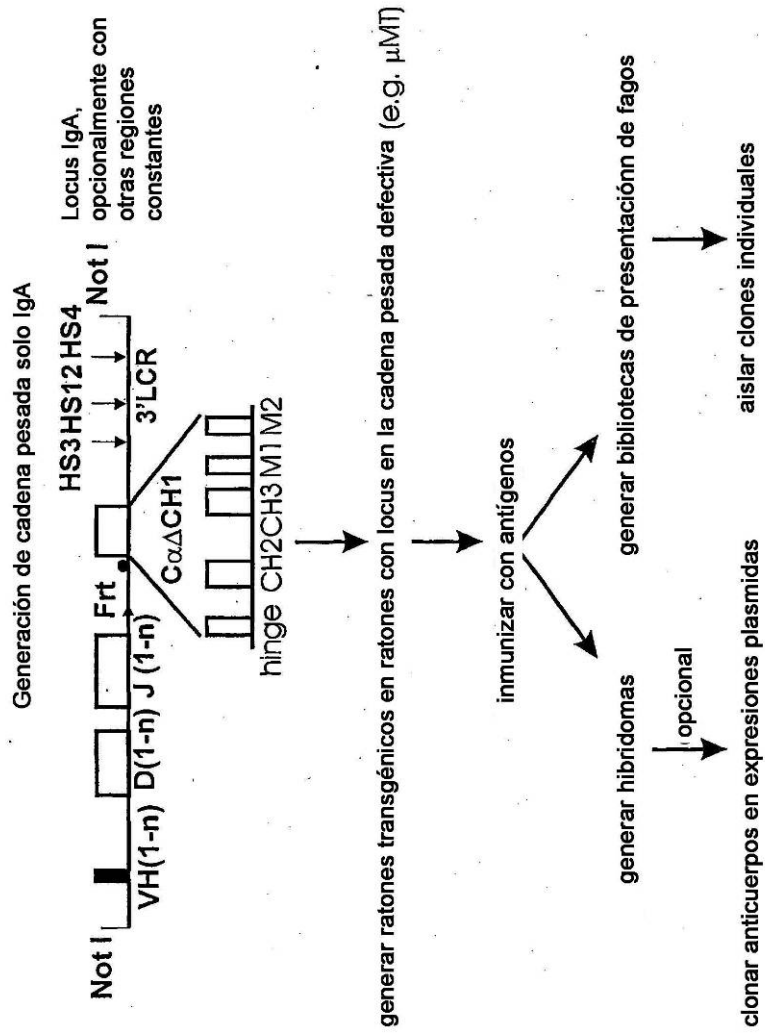


FIG. 9

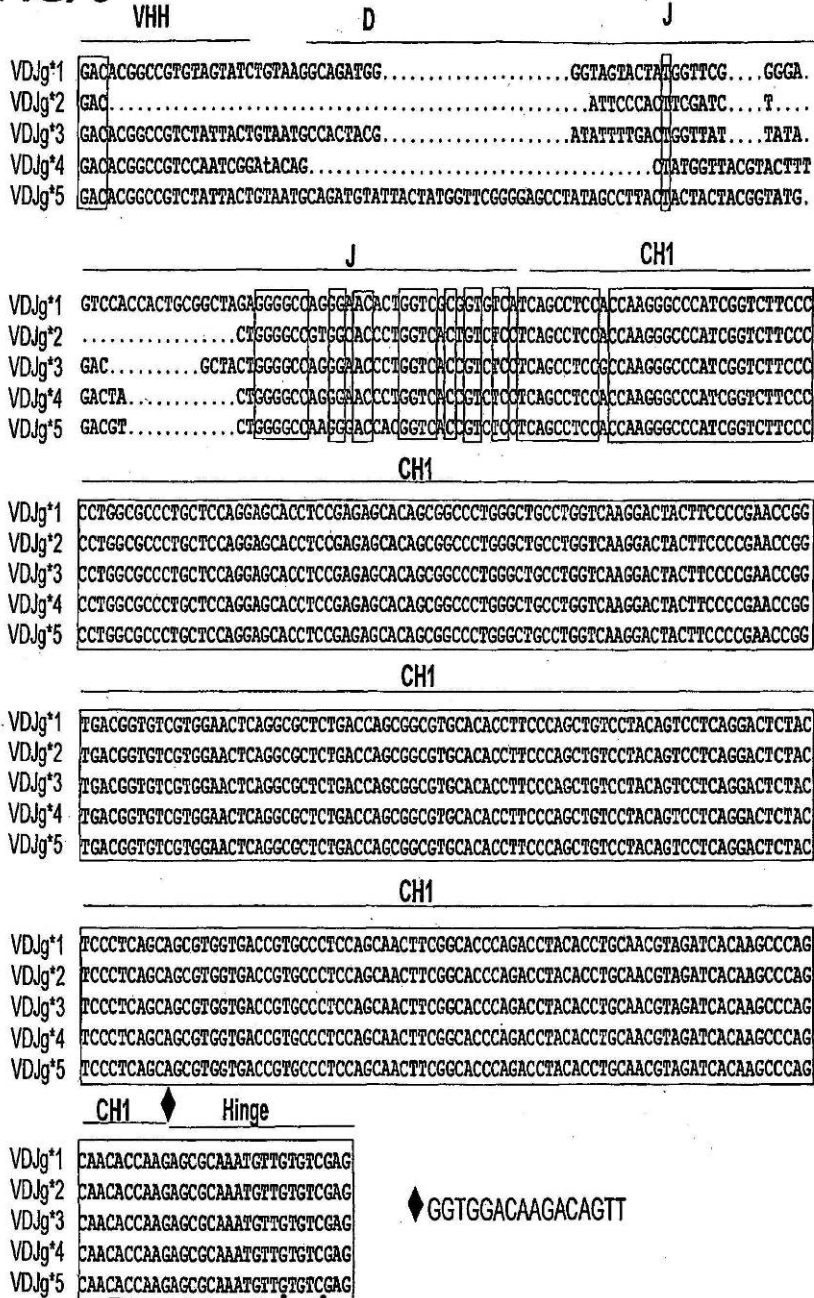


FIG. 10

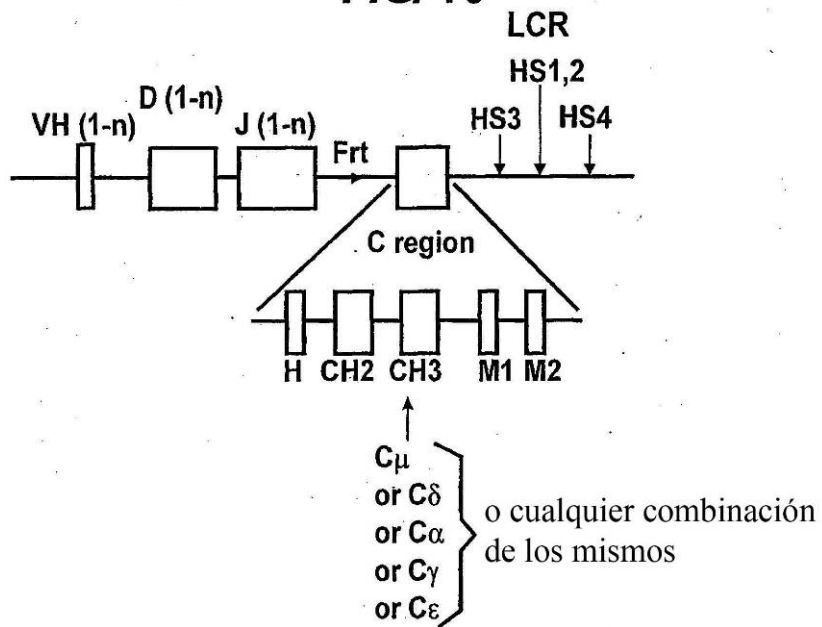
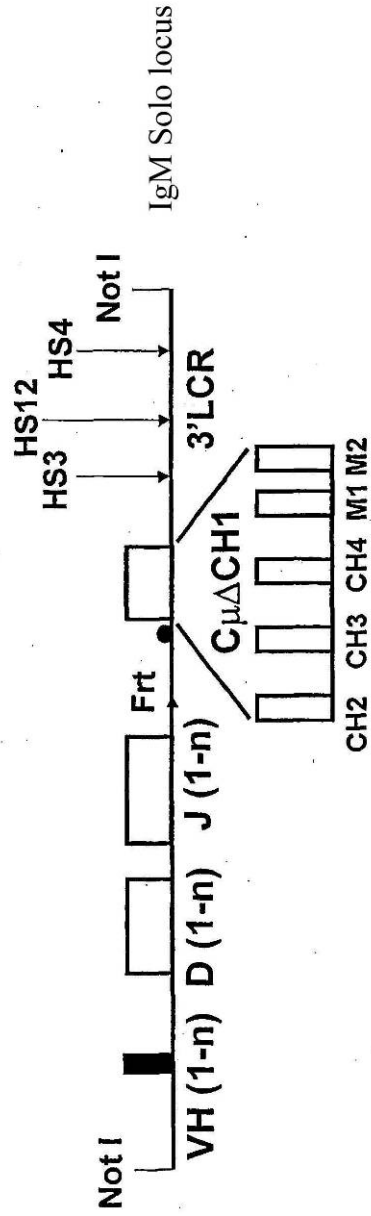
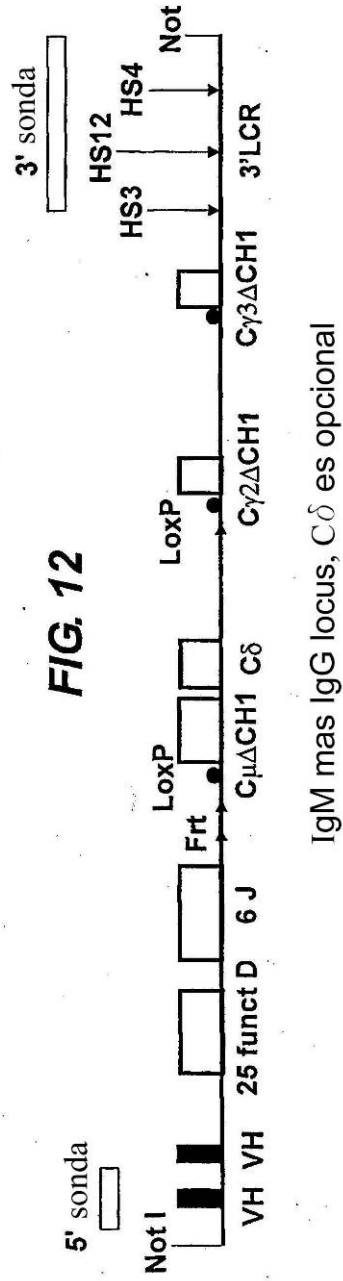


FIG. 11





IgM mas IgG locus, C δ es opcional

FIG. 13

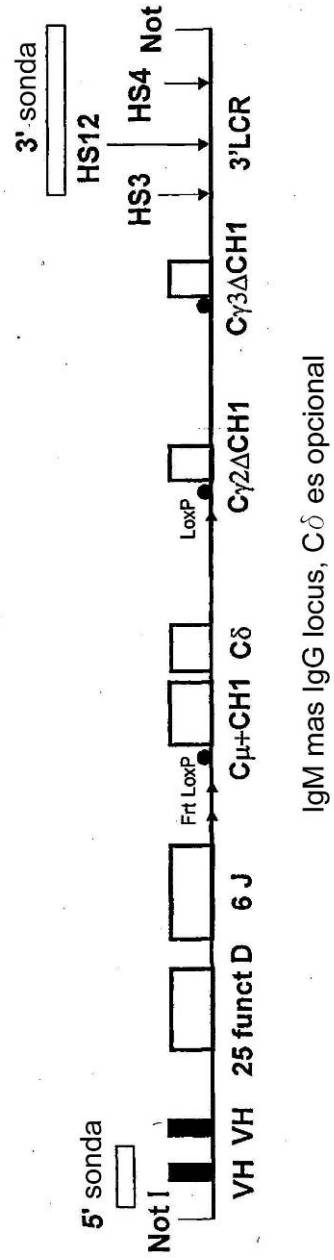
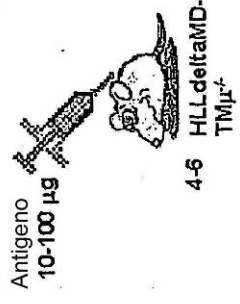


FIG. 14

CALENDARIO DE VACUNACIÓN

s.c. inyecciones los días 0, 14, 28, 42
i.p or i.v. Inyección el día 50
día 56

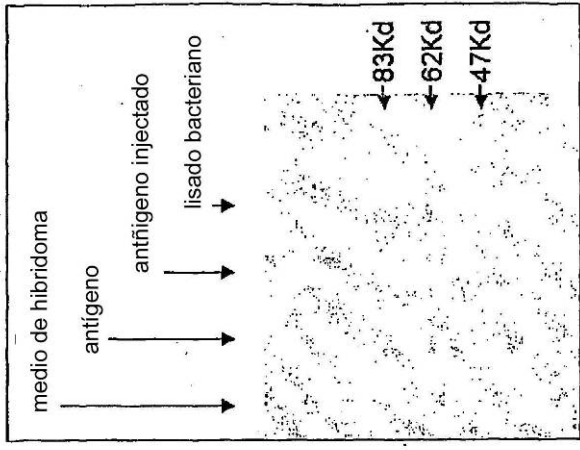


celulas de bazo →

Fusion + HAT

celulas de mieloma Sp2.0-Ag14 →

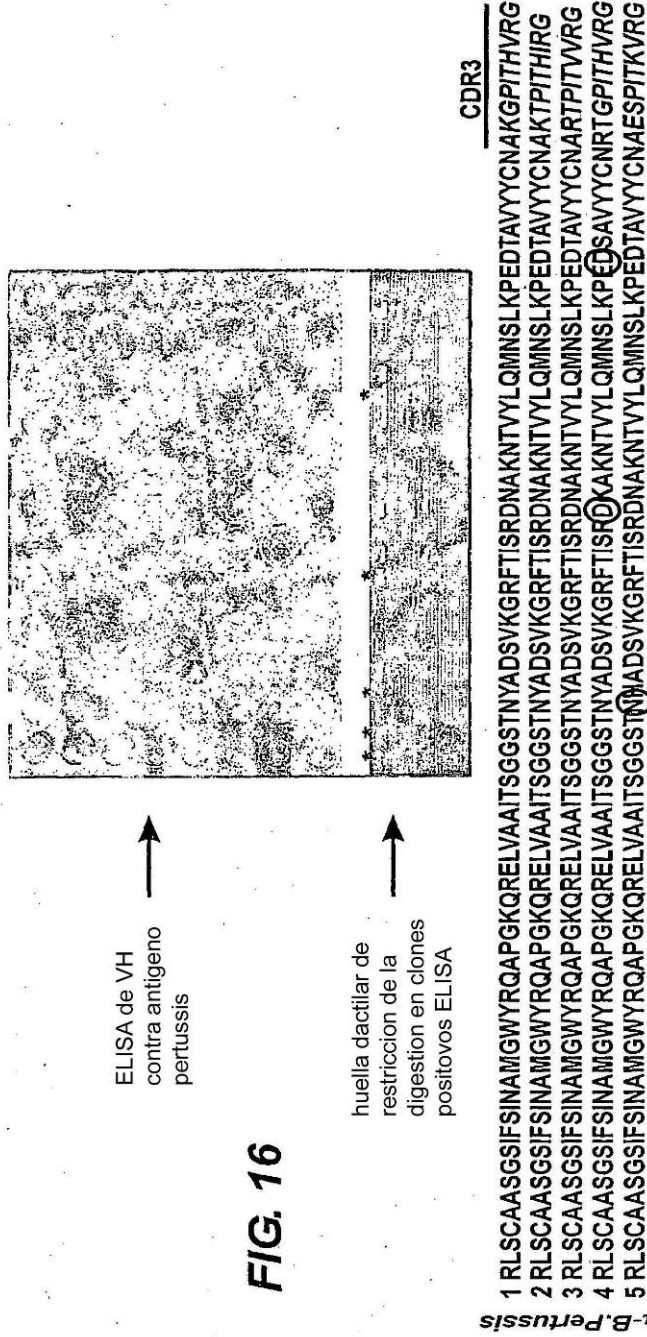
Híbridos
→
cultura en HAT
→
proyección
→
clonación



G18 HCab (IgG2 class)

VHH2

RLSCAASGSIFSNAMEGWSRQAPKQRELVAAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNI...



ne VHH1 RLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAEGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNNAKN
 Clone 1 RLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAEGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNNAKN
 Clone 2 RLSCAASGFTLDYYIGWFRQAEGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNNAKN
 Clone 3 RLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAEGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNNAKN
 CDR1

ne VHH2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKN
 Clone 1 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKN
 Clone 2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKN
 Clone 3 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKN
 CDR1 CDR2

VHH2 germline VHH2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCN.....
 CDR1 CDR2 CDR3

1 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG
 2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG
 3 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG
 4 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG
 5 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG

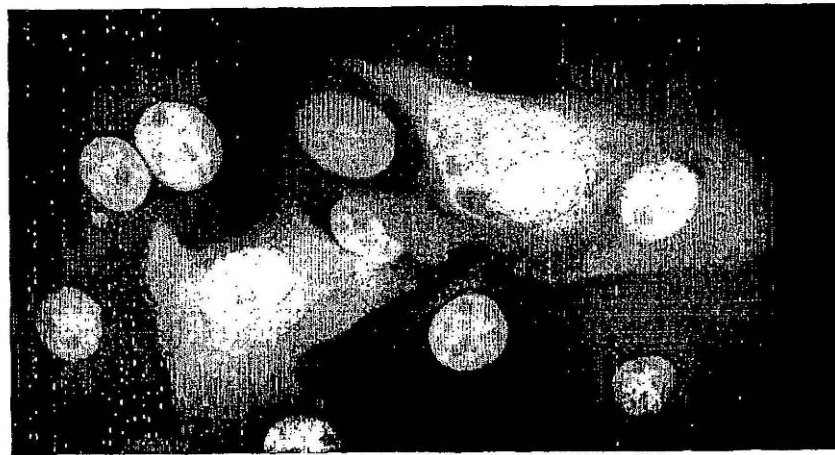
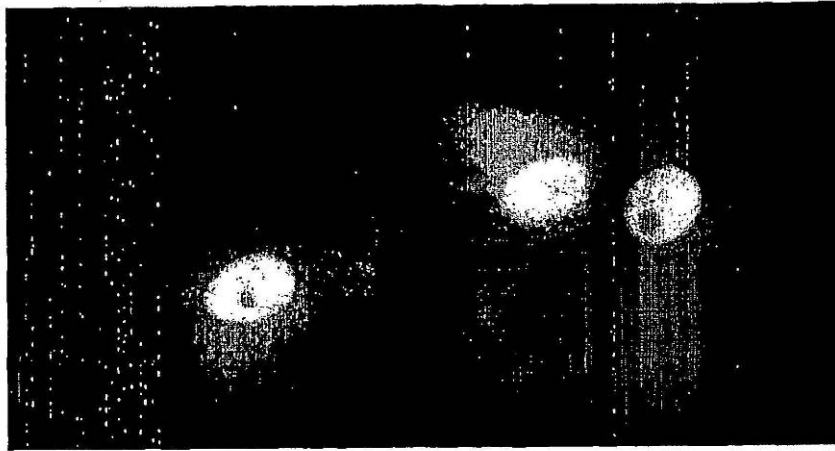
1 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAERAGDP.....
 2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCGVWFGELSD..
 3 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG..
 4 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG
 α-hsp70 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRGVII

CDR3 HINGE
 1...VHWGQGLTVSSERKCCV...
 2...VHWGQGLTVSSERKCCV...
 3...VHWGQGLTVSSERKCCV...
 4...VDYWGRTLVSSERKCCV...
 5...VSYWGQGLTVSSERKCCV...
 α-B. Pertussis

1...FDYWGQGLTVSSERKCCV...
 2...WFDYWGQGLTVSSERKCCV...
 3...YFDHYWGRTLVSSERKCCV...
 4...LPFDYWGQGLTVSSERKCCV...
 α-Tetanus
 α-hsp70 ...KYRFDYWGQGLTVSSERKCCV...

FIG. 17

FIG. 18



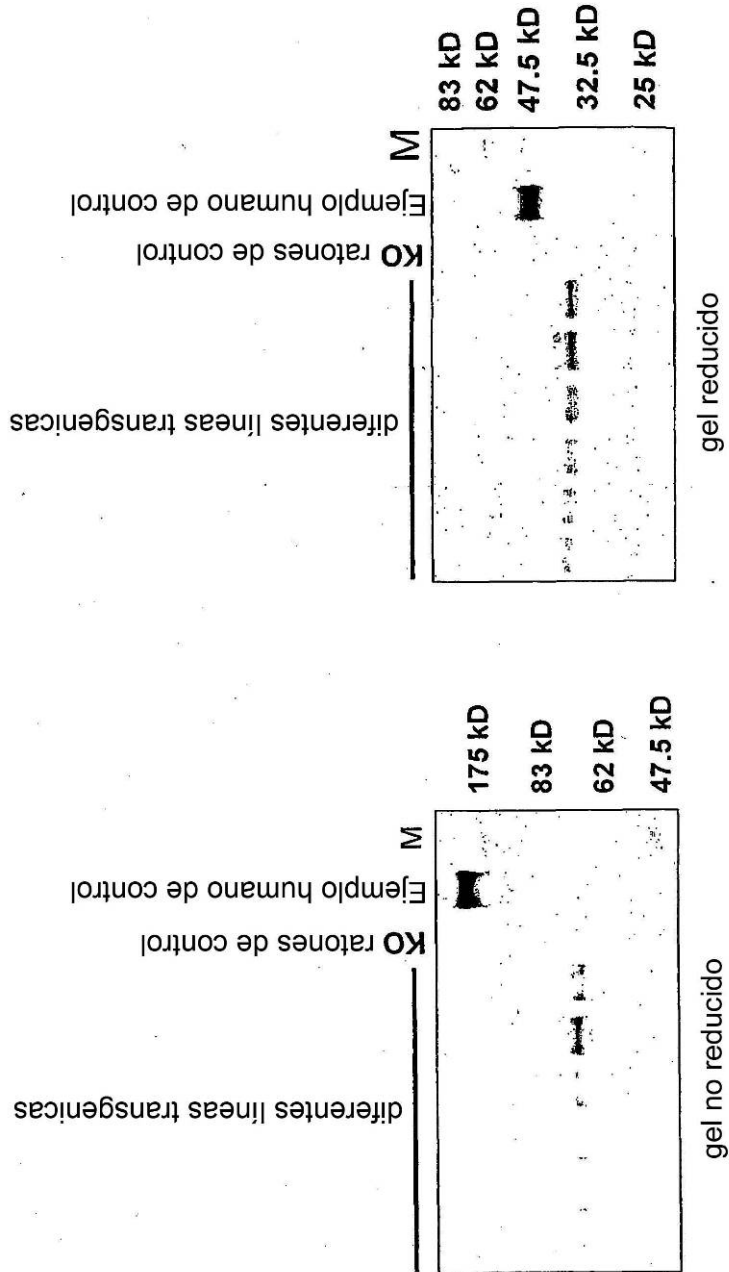


FIG. 19

FIG. 20

Fraccionamiento por tamaño de IgM humano mezclado con IgM de cadena simple humana
producida por ratones con locus IgM mas IgG

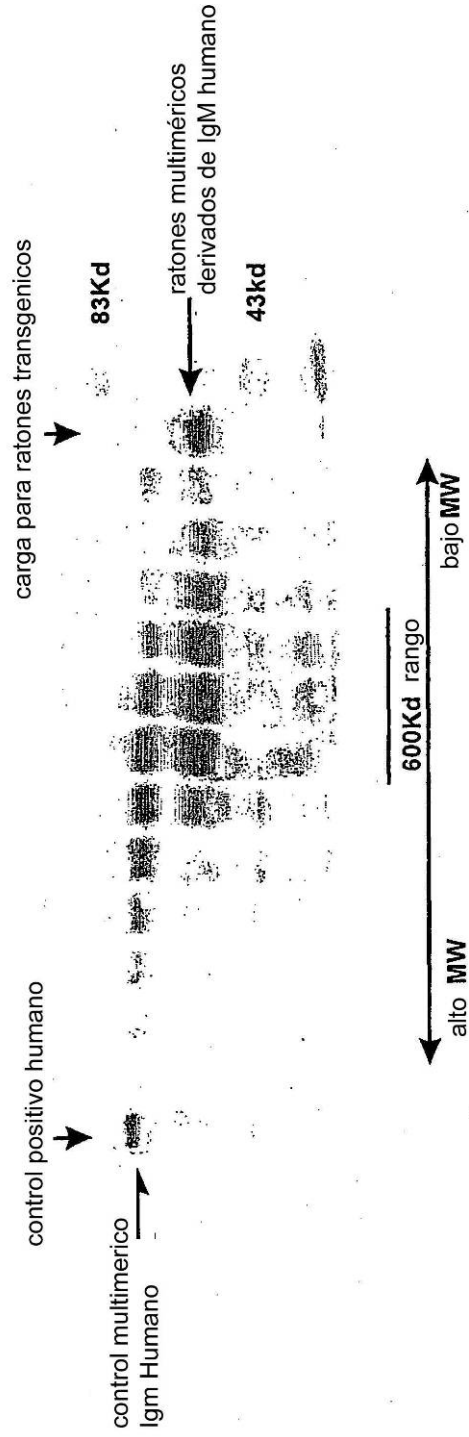


FIG. 21

ELISA de anticuerpos IgM y IgG de cadena sencilla generados contra TNF_{α} humano

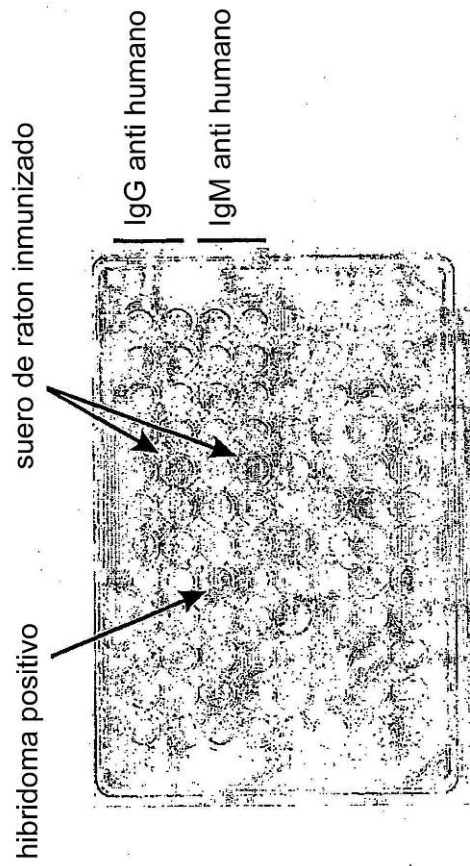
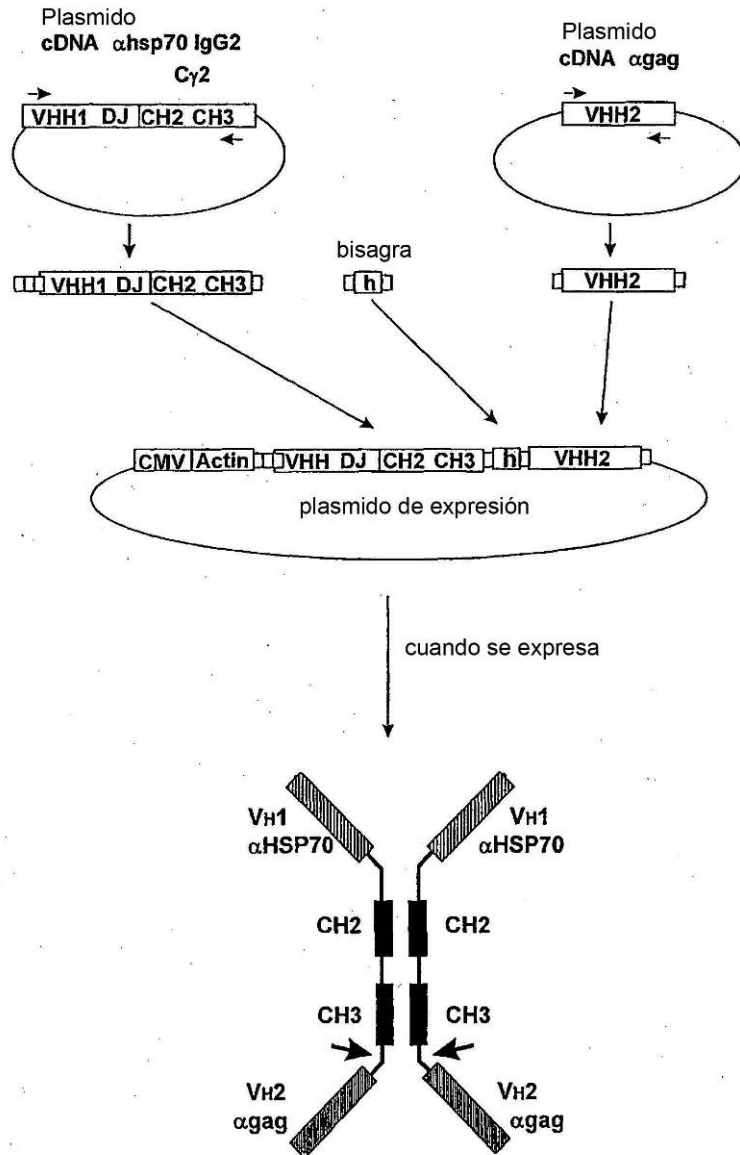


FIG. 22

Generación del plasmido de expresión de diacuerpo



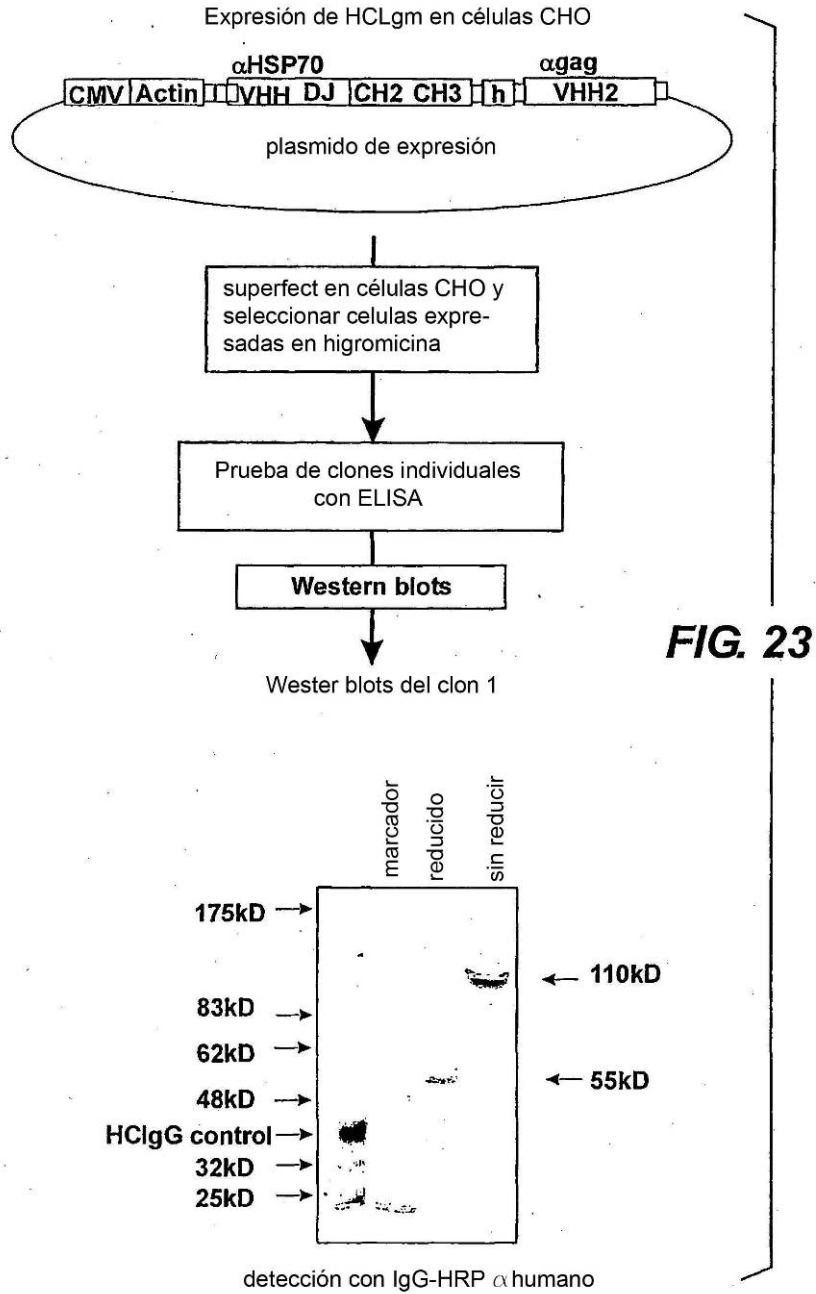


FIG. 24
caracterización del diacuerpo

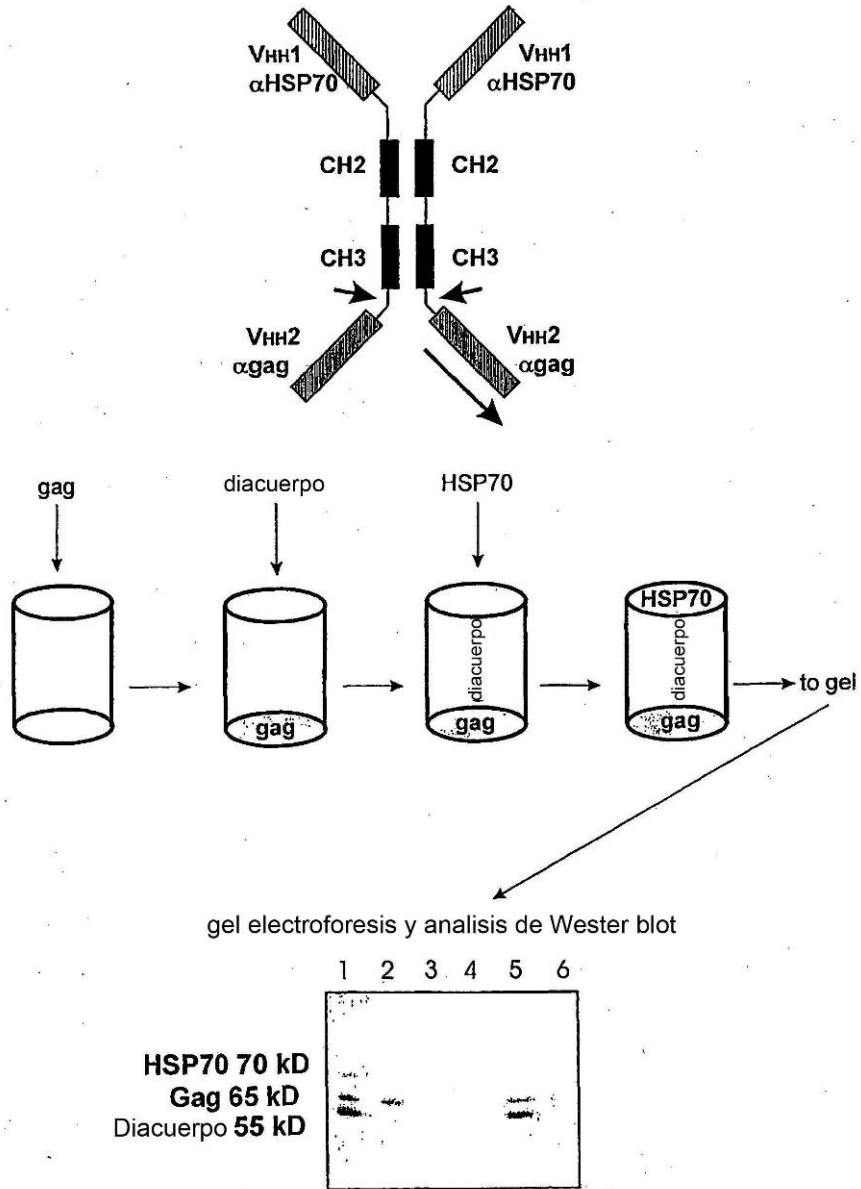
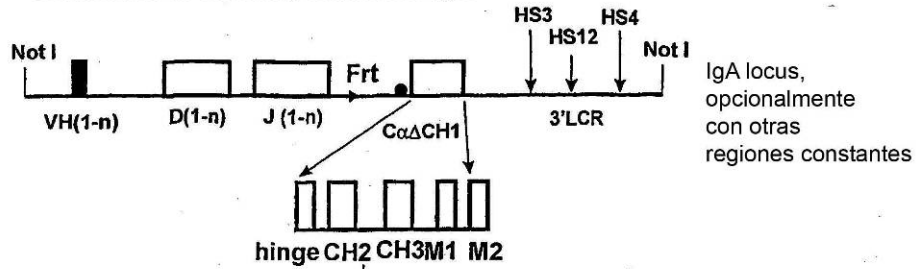


FIG. 25

Generación de cadena pesada solo IgA



generar ratones transgenicos en ratones con un locus de la cadena pesada defectiva (e.g. μ MT)

inmunizar con antígenos

generar hibridomas

generar bibliotecas de presentación de fagos

opcional

clonar anticuerpos en expresiones plasmidas

aislar clones individuales

lograr con tecnología de ADN recombinante anticuerpos biespecíficos y bivalentes como se muestra en las siguientes figuras

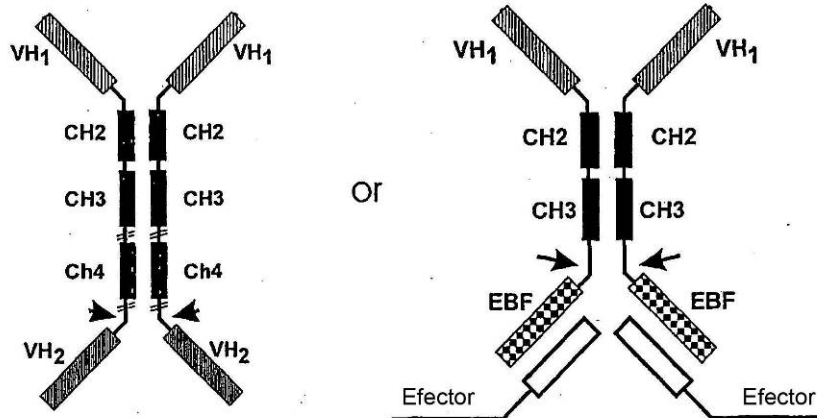


FIG. 26

Generación IgM multivalente solo para anticuerpos

