

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 497**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2005 E 10179784 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2311874**

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:
04.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GROVELD, FRANKLIN G.;
JANSSENS, RICHARD W.;
DRABEK, DUBRAVKA y
CRAIG, ROGER KINGDON

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 635 497 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).

Moléculas de unión**DESCRIPCIÓN**5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método de producción de anticuerpos únicamente de cadena pesada en ratas transgénicas.

10 **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 postraduccional 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 epítopes 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; Tacken 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 (BsIgG) que retienen la función efectora de la cadena pesada. Las BsIgG 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 (Tacken 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 constructos, 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).

5 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.

10 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).

15 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).

20 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).

25 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).

30 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).

35 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 Muldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 23, 25-28).

40 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).

45 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.

5 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).

10 El documento WO 2004 / 049794 describe anticuerpos de cadena única, un ratón transgénico y anticuerpos de cadena única producidos por dicho ratón transgénico.

15 Sigue habiendo una necesidad en la técnica para generar dominios funcionales de unión V_H únicamente a cadena pesada que retienen el máximo potencial de unión al antígeno para su uso en diversas aplicaciones clínicas, industriales y de investigación.

Breve resumen de la invención

20 La presente invención proporciona un método de producción de un anticuerpo únicamente de cadena pesada V_H que comprende:

- (a) inmunizar una rata transgénica que expresa un locus de cadena pesada V_H heterólogo con un antígeno en el que:
 - 25 (i) el locus de cadena pesada V_H comprende una región variable que comprende al menos un segmento génico V_H de origen natural, al menos un segmento génico D, al menos un segmento génico J y al menos una región constante de cadena pesada, y en la que los segmentos génicos V, D y J derivan de un ser humano;
 - (ii) cada región constante no se codifica a un dominio funcional C_{H1} ;
 - 30 (iii) un segmento génico V, un segmento génico D y un segmento génico J son capaces de recombinarse para formar una secuencia de codificación VDJ;
 - (iv) el locus recombinado de cadena pesada V_H , cuando se expresa, es capaz de formar un anticuerpo únicamente de cadena pesada soluble que comprende un dominio de unión V_H específico de un antígeno soluble y una región efectora constante desprovista de un dominio funcional C_{H1} ;
 - 35 y:
 - (b) aislar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo únicamente de cadena pesada V_H de las células que producen anticuerpos; y
 - (c) producir l anticuerpo únicamente de cadena pesada V_H usando técnicas de ADN recombinante.

40 En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende además clonar un locus V_H que codifica el dominio de unión de V_H del anticuerpo únicamente de cadena pesada V_H y expresa el dominio de unión de V_H en un sistema de expresión bacteriano, de levadura, mamífero o alternativo.

45 Preferentemente, dicha rata transgénica se ha modificado para tener una capacidad reducida para producir anticuerpos que incluyan cadenas ligeras

50 Preferentemente, los loci endógenos de cadena pesada de inmunoglobulina en el rata se eliminan o se silencian. Preferentemente, el locus de cadena pesada V_H comprende más de un segmento génico V, más de un segmento génico D y más de un segmento génico J.

Preferentemente, se ha seleccionado el segmento génico V para mostrar la mejora de las características de solubilidad.

55 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_{ϵ} , C_{δ} , C_{γ} y/o C_{μ} . 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_{ϵ} , C_{δ} , C_{γ} C_{μ} .

60 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 humano y al menos un segmento J humano en el que un segmento del gen V, un segmento del gen D y un segmento del gen J pueden recombinarse para formar una secuencia codificante VDJ. El locus 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 se deriva usando segmentos del gen D y J humanos.

65

El locus 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.

5 La región constante de la cadena pesada del locus 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.

10 El método de la invención da lugar a la maduración de la célula B esencialmente normal. El dominio de unión V_H puede carecer de un bucle CDR3 de tipo camélido ampliado.

La invención también proporciona un método de producción y selección de anticuerpos únicamente de cadena pesada que comprende los pasos de:

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

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

25 Los dominios de unión V_H pueden producirse también por:

- a) inyectando un antígeno en el mamífero transgénico descrito en la presente;
 30 b) aislando una célula o tejido que expresa un anticuerpo únicamente de cadena pesada, específico del antígeno de interés;
 c) clonando el locus V_H a partir del ARNm derivado de la célula o tejido aislados;
 d) mostrando la proteína codificada usando un fago o biblioteca similar
 e) identificando los dominios V_H específicos del antígeno; y
 35 f) expresando los dominios V_H solos o como una proteína de fusión en sistemas de expresión bacterianos, de levadura o alternativos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 Los presentes inventores han superado las limitaciones de la técnica anterior y muestran que los animales transgénicos, en particular ratones, pueden ser generados utilizando "micro loci" para producir anticuerpos únicamente de cadena pesada de clase específica, o una mezcla de diferentes clases de anticuerpos únicamente de cadena pesada que se segregan por el plasma o las células B. Estos pueden ser utilizados o para generar un suministro de confianza de anticuerpos únicamente de cadena pesada de clase específica utilizando tecnología de hibridoma establecida o como una fuente de dominios de unión V_H únicamente a cadena pesada, preferentemente un dominio de unión únicamente de cadena pesada V_H de origen humano, que están libres de funciones efectoras pero que retienen la función de unión.

50 Los anticuerpos únicamente de cadena pesada que pueden ser generados por el método de la invención muestran una alta afinidad de unión, dando lugar a transposiciones del segmento génico V, D y J y mutaciones somáticas, en general en ausencia de un bucle CDR3 ampliado. Se observó una maduración de la célula B esencialmente normal con altos niveles del anticuerpo únicamente de cadena pesada presente en el plasma aislado (siempre que el dominio C_H1 se haya eliminado de todas las clases del anticuerpo presentes en el locus recombinante). La maduración de la célula B y la secreción de dímeros montados (por ejemplo, IgG) o multímeros (por ejemplo, IgM) no tiene ninguna dependencia en la presencia o expresión de los genes de cadena ligera.

55 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.

65

Se muestra que los ratones transgénicos pueden programarse para producir clases preferentes de anticuerpo únicamente de cadena pesada en respuesta al estímulo del antígeno, por ejemplo, IgG solo frente a IgM solo o, por ejemplo, mezclas de IgA, IgG y IgM.

5 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 constructos 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).

15 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.

25 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.

30 Otros dominios efectores, 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 efectores.

35 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.

40 Constructos preferidos 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.

45 Los dominios V_H resultantes pueden no comprender un bucle CDR3 de tipo camélido ampliado. Esto da lugar a un dominio V_H que exhibe una diversidad CDR3 y una maduración de afinidad operativamente unida a una región efectora constante. Esta última asegura la secreción funcional y opcionalmente el conjunto en el ratón parental.

50 Estas observaciones tienen importantes implicaciones para la derivación mejorada y simplificada de los dominios V_H solubles de alta afinidad que se incorporan a la maduración de afinidad mediante la mutación somática. Los dominios V_H pueden ser expresados solo en sistemas bacterianos u otros microorganismos o segregados por hibridomas o células transfectadas en el cultivo. Los dominios de unión V_H de origen humano tienen amplias aplicaciones en el campo de la salud como medicinas, diagnósticos y reactivos, con aplicaciones agrícolas, ambientales e industriales paralelas.

60 Las moléculas efectoras de cadena pesada pueden ser modificadas para estar libres de dominios funcionales, por ejemplo, los dominios carboxiterminal C_H4, siempre que la modificación no afecte a los mecanismos secretorios que evitan el conjunto de superficie celular y por consiguiente la maduración de la células B. Los exones C_H1 solo se eliminan a partir del locus heterólogo o se ausentan a partir del locus. Las características adicionales pueden modificarse en el locus, por ejemplo para mejorar la glicosilación, o añadir una función.

65 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. El uso de segmentos génicos V, D y J que comprende segmentos génicos V seleccionados al azar, o seleccionados para mejorar la solubilidad, producirá anticuerpos funcionales únicamente de cadena pesada humana.

Los anticuerpos obtenidos en el método de la invención tienen ventaja sobre los de la técnica anterior en que son de básicamente cualquier clase única o conocida de origen humano. Los anticuerpos que son de alta afinidad dan lugar a una combinación de recombinación VDJ y maduración de afinidad *in vivo*. Los fragmentos de los mismos pueden ser aislados, caracterizados y producidos utilizando métodos bien establecidos conocidos por los expertos en la técnica.

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.

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. (normalmente 25 segmentos del gen D).

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. (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 génico V" abarca un segmento génico V de origen natural derivado de un humano, que se ha seleccionado opcionalmente para mejorar características, tales como la solubilidad.

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.

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.

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.

El locus heterólogo de cadena pesada comprende una región de ADN que codifica una región constante de cadena pesada que proporciona funciones efectoras *in vivo* (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD o isotipos de las mismas).

La región constante de la cadena pesada

Operacionalmente, una región constante de cadena pesada se codifica por un segmento génico de origen natural o modificado que es capaz de recombinarse con un segmento génico V, un segmento génico D y un segmento génico J en una célula B. Preferentemente, la región constante de cadena pesada se deriva a partir del locus de inmunoglobulina.

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 $C\delta$, $C\gamma_{1-4}$, $C\mu$, $C\epsilon$ 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 $C\mu$ y $C\delta$.

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.

La expresión de todo o parte de un sitio C_γ 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 $C\mu$.

La región constante de la cadena pesada puede ser de origen humano, en particular cuando el anticuerpo de la cadena pesada va a usarse para aplicaciones terapéuticas en seres humanos. Cuando 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 deleccionarse 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.

Ratas

5 El mamífero transgénico usado en los métodos de la invención es una rata.

Preferentemente, se generan ratas transgénicas utilizando tecnología de inyección de ovocitos establecida, y si está establecida, tecnología o clonación de células ES.

10 Ventajosamente, los loci endógenos de cadena pesada de inmunoglobulina y opcionalmente de cadena ligera de la rata se eliminan o se silencian cuando se expresa un anticuerpo únicamente de cadena pesada según los métodos de la invención.

15 Este enfoque de generar anticuerpos únicamente de cadena pesada como se ha descrito anteriormente puede ser de uso particular en la generación de anticuerpos para el uso terapéutico humano ya que frecuentemente la administración de anticuerpos a una especie de vertebrado que es de origen diferente a la fuente de anticuerpos da lugar a la aparición de una respuesta inmune contra aquellos anticuerpos administrados.

20 La rata transgénica puede ser modificada para tener una capacidad reducida para producir anticuerpos que incluyen cadenas ligeras.

25 Las células que producen anticuerpos pueden derivarse de ratas transgénicas según la presente invención y utilizarse, por ejemplo, en la preparación de hibridomas para la producción de anticuerpos únicamente de cadena pesada como se ha definido anteriormente. Además, o alternativamente, las secuencias de ácido nucleico pueden ser aisladas a partir de ratas transgénicas según la presente invención y utilizadas para producir anticuerpos únicamente de cadena pesada del dominio V_H o complejos bi funcionales / bi - específicos de los mismos, utilizando técnicas de ADN recombinante que son familiares para los expertos en la técnica.

30 Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos únicamente de cadena pesada específicos del antígeno pueden generarse por inmunización de una rata transgénica de acuerdo con la presente invención.

35 Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la producción de anticuerpos únicamente de cadena pesada inmunizando una rata transgénica de acuerdo con la presente invención con un antígeno.

Anticuerpos únicamente de cadena pesada y fragmentos de los mismos.

40 El dominio de unión únicamente a cadena pesada específico de un antígeno, es decir, dominio de unión V_H , se expresa por el locus V_H como resultado de la recombinación entre los segmentos génicos V, D y J seguido posteriormente por la mutación somática. Según la invención, los loci V_H pueden ser clonados a partir de, por ejemplo, ARNm aislado a partir de una célula que produce un anticuerpo de un ratón transgénico inmunizado según se describe anteriormente. Las secuencias clonadas pueden a continuación expresarse utilizando un fago (Ward et al., (1989) Nature, 341, 544 - 546) o bibliotecas de expresión similares, por ejemplo utilizando sistemas basados en levaduras (Boder and Wittrup, (1997) Nat. Biotechnol., 15, 553 - 7) y dominios de unión V_H específicos al antígeno identificados. Los dominios de unión a cadena pesada específicos de un antígeno pueden luego ser producidos solos o como proteínas de fusión en sistemas de expresión bacterianos, de levaduras o alternativos. Las secuencias que codifican los dominios de unión V_H pueden ser también clonadas a partir de hibridomas caracterizados derivados por procedimientos clásicos de ratones transgénicos inmunizados. Estos pueden utilizarse para producir dominios de unión V_H y derivados de los mismos que incluyen la modificación de clases de anticuerpos definidos (por ejemplo, IgE o IgA) y variantes de los mismos con diferentes funciones efectoras.

55 Por consiguiente, la invención también proporciona un método para producir un dominio de unión V_H que comprende los pasos de:

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

65 Alternativamente, los fragmentos que contienen el dominio V_H pueden generarse a partir de anticuerpos

únicamente de cadena pesada de la invención usando tecnología de escisión enzimática o química y la separación posterior del fragmento que contiene el dominio V_H de otros productos de la escisión.

5 Cuando el dominio de unión V_H se aísla a partir de un hibridoma caracterizado, la secuencia del dominio de unión V_H clonada derivada de ARNm puede ser directamente clonada en un vector de expresión sin recurrir a las etapas de selección adicional utilizando sistemas de expresión en fago y otros de expresión.

10 Los sistemas de producción para anticuerpos únicamente de cadena pesada que incorporan regiones efectoras incluyen células mamíferas en cultivo (por ejemplo células CHO), vegetales (por ejemplo maíz, cabras transgénicas, conejos, ganado, oveja, pollos y larvas de insectos para tecnología de crianza masiva. Otros sistemas de producción, incluyendo infección vírica (por ejemplo baculovirus en larvas de insecto y líneas celulares) son alternativas al cultivo celular y enfoques de línea germinal. También serán familiares otros métodos de producción para los expertos en la técnica. Cuando hay un requisito para ensamblaje de Iga o IgM de únicamente cadena pesada, la co-expresión de una "cadena J" es beneficiosa. Se conocen en la técnica métodos adecuados de producción de dominios únicamente de unión V_H . Por ejemplo, se han producido dominios de unión V_H de camélido en sistemas bacterianos y se han producido homodímeros únicamente de cadena pesada de camélido en hibridomas y células de mamífero transfectadas (véase Reichmann and Muyldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25 - 38).

20 Los métodos también están bien establecidos para la expresión de los dominios de unión V_H humanos modificados derivados utilizando tecnología de expresión en fago (Tanha et al., (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774 – 24780 y referencias en el mismo).

25 Se ha demostrado que las larvas de insectos de líneas de moscas transgénicas producen fragmentos funcionales de anticuerpo únicamente de cadena pesada en la hemolinfa con características indistinguibles del mismo anticuerpo producido por células de mamífero (PCT / GB2003 / 0003319).

30 Un anticuerpo únicamente de cadena pesada producido por el método de la invención o un fragmento del mismo como se describe en la presente puede usarse como un reactivo de unión intracelular, o un aczima.

Un anticuerpo de cadena única específico del antígeno o dominio de unión V_H producido de acuerdo con el método de la invención puede ser utilizado como un inhibidor de la enzima o un bloqueador del receptor.

35 Un dominio V_H fusionado a una molécula efectora puede ser utilizado como un terapéutico, agente de formación de imágenes, diagnóstico, abzima o reactivo.

Breve descripción de las figuras

40 **La Figura 1:** muestra la estrategia para la generación de ratones transgénicos que expresan un locus de IgG y la generación funcional de anticuerpos únicamente de cadena pesada y dominios V_H como resultado del estímulo de un antígeno.

45 **La Figura 2:** muestra la estrategia para la generación de ratones transgénicos que expresan un locus de IgM y la generación funcional de anticuerpos únicamente de cadena pesada y dominios V_H como resultado del estímulo de un antígeno.

50 **La Figura 3:** muestra la estrategia para la generación de ratones transgénicos que expresan un locus de IgA y la generación funcional de anticuerpos únicamente de cadena pesada y dominios V_H como resultado del estímulo de un antígeno.

55 **La Figura 4:** Alineamiento de secuencia de los productos PCR obtenidos a partir del ADNc de médula ósea utilizando cebadores V_{HH1} y V_{HH2} en combinación con el cebador Cy2 humano a partir de ratones que contienen un locus con regiones constantes que tienen una mutación de corte y empalme de camélido para eliminar CH1. Los resultados muestran que CH1 no se elimina.

60 **Figuras 5 – 8:** Estructura de constructos de V_H / V_H de camélido (VHH). 1 – n corresponde a cualquier número de genes V_H , o segmentos D o J. El complemento normal del locus humano es de 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 CH4 adicional entre CH3 y M1. El (los) gen (es) V_H se han mutado para proporcionar solubilidad según se describe en el dominio público. Los genes V_H , segmentos D y J y exones C son preferentemente humanos, pero podrían ser de cualquier otra especie que incluye camélidos. En este último caso, los genes V_H de camélido (VHH) no se mutarían ya que son naturalmente solubles.

Figura 9: Programa de inmunización del ratón y ensayo de anticuerpo para la generación de IgG únicamente de cadena pesada contra HSP70 de *E. coli*.

5 **Figura 10:** Análisis de citometría de flujo y resultados de inmunohistoquímica para células de bazo derivadas de ratones transgénicos.

Figura 11: Resultados del análisis ELISA de ratones transgénicos inmunizados con DKTP y análisis de secuencias de biblioteca de anticuerpos resultante.

10 **Figura 12:** Ejemplos de mutaciones somáticas y transposición de VDJ observada en ratones transgénicos inmunizados.

Figura 13: Resultados del ensayo de inmunotinción en la línea celular Tet - on transfectada con el plásmido de respuesta que contiene el anticuerpo A5.

15 **Figura 14:** Resultados del análisis de transferencia Western de sueros de las líneas de ratón transgénico.

Figura 15: Fraccionamiento del tamaño de IgM humana mezclada con IgM de cadena única humana producida por el locus de IgM más IgG de ratones.

20 **Figura 16:** Resultados del análisis de ELISA de anticuerpos IgM y IgG de cadena única producidos contra TNF α humano.

Técnicas generales

25 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*, 2^a ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. y Ausubel y col., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4^a 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.

30 35 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.

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.

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

50 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.

55 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.

Ejemplo 1

60 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 γ 2, C γ 3 y 3' LCR de inmunoglobulina de la cadena pesada humana. Los genes C γ 2 y C γ 3 humanos contuvieron una mutación de corte y empalme de G a A. La presencia del sitio F_{rt} 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

65

de C_H1 incompleta (Figura 9).

Constructos

5 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
10 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_γ3 (IgG3). El clon de Bac 11771 de una biblioteca genómica humana diferente (Incyte Genomics, CA, EE.UU.) se usó como fuente del gen C_γ2 (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_γ3 y C_γ2 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).

25 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.

30 Entonces pudieron crearse más constructos.

Sitio solo de IgM

35 Con el fin de obtener la constructo de IgM (Figura 6), 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)

40 Con el fin de obtener la constructo de IgM más IgG (Figura 7), 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_γ2 y C_γ3 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 constructo véase anteriormente.

Sitio de IgM más IgG (C_δ es opcional)

50 Con el fin de obtener la constructo de IgM más IgG (Figura 8), 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_γ2 y C_γ3 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

60 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 $\mu\text{MT}^{-/-}$. 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 $C_{\gamma 2}$ como $C_{\gamma 3}$ se había delecionado (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 bazo se incorporaron en compuesto OCT. Secciones de criostato de 5 μm 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 10 muestra el análisis inmunohistoquímico de secciones de bazo congeladas de 5 μm de ratones transgénicos $\mu\text{MT}^{-/-}$, WT y HLL y HLL-MD en el nivel inicial $\mu\text{MT}^{-/-}$. 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 1×10^6 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 10.

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 9)

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 μg o 5 μg 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 9).

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 4A 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 αHSP70 es secretado como dímero de solo cadena pesada (transferencias Western bajo condiciones de gel desnaturizante (dímero) y gel no desnaturizante (monómero) Fig. 9). 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 7) se inmunizaron con $\text{TNF}\alpha$ para obtener anticuerpos HC-IgM. Uno de los tres ratones mostró

5 sueros positivos en ensayos de ELISA convencionales. Una fusión de mieloma convencional dio un hibridoma de IgM positivo (Figura 11). 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 15). 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. 15).

ELISA de Ig en suero

10 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).

25 El ELISA para la detección de sdAb solubles específicos para antígeno de la biblioteca de fagos de IgG2 se muestra en la Figura 16. Se usaron sdAb 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 sdAb contra *B. pertussis*.

Construcción y cribado de bibliotecas de anticuerpos

30 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'-AATCTGGGCAGCGGCCGCTCGACACAACATTTGCGCTC-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.

40 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

45 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.

55 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 .

60 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 12). Por tanto, el receptor de antígeno IgG solo de cadena pesada humana puede proporcionar las señales necesarias para la maduración de linfocitos B.

Inmunotinción

65

La Figura 13 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 rTTA fue una IgG3 con la siguiente secuencia:

241 AGACTCT

80 R L

301 CCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTC

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

361 CAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTTCGAGCTATTACTAGTGGTGGTAGCACAAGGTATGCAG

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

421 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGC

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

481 AAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTTGATCTCTATGGTTC

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

541 GGGGAGCCCGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCAGAGCTCA

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

La bisagra IgG3 empieza en el aminoácido 198 ELKTPL. Para comparación véase la región bisagra de IgG2 en la Figura 12.

Análisis de transferencia Western

La Figura 14 muestra transferencias Western de sueros de diferentes líneas de ratón transgénico que contienen el sitio IgM más IgG (Figura 5) 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 14, panel derecho) y no reductoras (Figura 14, 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 14 se detectó con un anticuerpo dirigido contra IgG humana mediante procedimientos convencionales.

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 8) 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 15. 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 8) inmunizado con TNF α humano. Los resultados se muestran en la Figura 16. 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.

ES 2 635 497 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM

5 <110> CRAIG, Roger Kingdon

<120> MOLECULAS DE UNION

<130> PO55642EP

10 <150> GB0416392.9
<151> 2004-07-22

15 <150> GB0511881.5
<151> 2005-06-10

<150> EP05766644.8
<151> 2005-07-22

20 <160> 35

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

25 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Cebador de PCR

<400> 1

aatctgggca gcgccgcct cgacacaaca ttgcgctc 39

35 <210> 2

<211> 106

<212> ADN

<213> HCAb (IgG3) Humana frente a rtTA

40 <400> 2

```
agactctcct gtgcagcctc tgaagcctc ttcagtatca atgccatggg ctggtaccgc 60
caggctccag ggaagcagcg cgagttggtc gcagctatta ctagtgggtg tagcacaagg 120
tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgccaa gaacacgggtg 180
45 tatctgcaaa tgaacagcct gaaacctgag gacacggcgg tctattactg tttgatctct 240
atggttcggg gagcccgttt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 300
gagctcaaaa cccactt 318
```

<210> 3

50 <211> 106

<212> PRT

<213> HCAb (IgG3) Humana frente a rtTA

<400> 3

55

60

65

ES 2 635 497 T3

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 8
 gtcgaattct cattccgagg agacggtgac ctgggtc 37

10 <210> 9
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia bisagra de IgG

15 <400> 9
 gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgccca 36

<210> 10
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia bisagra de IgG de reemplazo

<400> 10
 25 agcttctgag cgcaaaccac cagtcgagcc accaccgcca ccac 44

<210> 11
 <211> 44
 <212> ADN
 30 <213> Complemento de Secuencia bisagra de IgG de reemplazo

<400> 11
 tcgagtggg gcggtgggg ctcgactggt ggtttgcgct caga 44

35 <210> 12
 <211> 404
 <212> ADN
 <213> VDJg*1

40 <400> 12

	gacacggcgg	tgtagtatct	gtaaggcaga	tggggtagta	ctatggttcg	gggagtccac	60
	cactgcggct	agaggggcca	gggaacactg	gtcgcggtgt	catcagcctc	caccaagggc	120
	ccatcgggtc	tccccctggc	gccttgctcc	aggagcacct	ccgagagcac	agcggccctg	180
45	ggctgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaa	ccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcagggcgt	240
	ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttcccagct	gtcctacagt	cctcaggact	ctactcctc	300
	agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcaac	ttcggcacc	agacctacac	ctgcaacgta	360
	gatcacaagc	ccagcaacac	caagagcgca	aatggttgtt	cgag		404

<210> 13
 50 <211> 352
 <212> ADN
 <213> VDJg*2

<400> 1

55

	gacattccca	cttcgatctc	tggggccgtg	gcaccctggt	cactgtctcc	tcagcctcca	60
	ccaagggcc	atcggctctc	cccctggcgc	cctgctccag	gagcacctcc	gagagcacag	120
	cgccctggg	ctgcctggtc	aaggactact	tcccogaacc	ggtgacggtg	togtggaaact	180
	cagggcgtct	gaccagcggc	gtgcacacct	tcccagctgt	cctacagtcc	tcaggactct	240
60	actccctcag	cagcgtggtg	accgtgccct	ccagcaactt	cggcaccag	acctacacct	300
	gcaacgtaga	tcacaagccc	agcaaacacca	agagcgcaaa	tgttgtgtcg	ag	352

<210> 14
 <211> 394
 65 <212> ADN

ES 2 635 497 T3

<213> VDJg*3

<400> 14

5	gacacggcgcg	totattactg	taatgccact	acgatatttt	gactggttat	tatagacgct	60
	actggggcca	gggaaccctg	gtcaccgctc	cctcagcctc	cgccaagggc	ccatcggtct	120
	tccccctggc	gocctgctcc	aggagcacct	ccgagagcac	agcggccctg	ggctgcctgg	180
	tcaaggacta	cttccccgaa	ccggtgacgg	tgctgtggaa	ctcaggcgct	ctgaccagcg	240
	gcgtgcacac	cttcccagct	gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcggtg	300
	tgaccgtgcc	ctccagcaac	ttcggcacc	agacctacac	ctgcaacgta	gatcacaagc	360
10	ccagcaacac	caagagcgca	aatgttgtgt	cgag			394

<210> 15

<211> 380

15 <212> ADN

<213> VDJg*4

<400> 15

20	gacacggcgcg	tccaatcgga	tacagctatg	gttacgtact	ttgactactg	gggccagggg	60
	accctgggtca	ccgtctctct	agcctccacc	aagggcccat	cggtcttccc	cctggcgccc	120
	tgctccagga	gcacctccga	gagcacagcg	gcctggggct	gcctgggtcaa	ggactacttc	180
	cccgaaccgg	tgacggtgtc	gtggaactca	ggcgctctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	240
	ccagctgtcc	tacagtctct	aggactctac	tccctcagca	gcgtgggtgac	cgtgccctcc	300
	agcaacttcg	gcaccagac	ctacacctgc	aacgtagatc	acaagcccag	caacaccaag	360
25	agcgcaaatg	ttgtgtcgag					380

<210> 16

<211> 417

30 <212> ADN

<213> VDJg*5

<400> 16

35	gacacggcgcg	totattactg	taatgcagat	gtattactat	ggttcgggga	gcctatagcc	60
	ttactactac	tacggtatgg	acgtctgggg	ccaagggacc	acggtcaccg	tctcctcagc	120
	ctccaccaag	ggcccacg	tcttccccct	ggcgccctgc	tccaggagca	cctccgagag	180
	cacagcggcc	ctgggctgcc	tggtcaagga	ctacttcccc	gaaccgggtga	cggtgtcgtg	240
	gaactcaggc	gctctgacca	gcgcgctgca	caccttcccc	gctgtcctac	agtccctcag	300
	actctactcc	ctcagcagcg	tggtgaccgt	gccctccagc	aacttcggga	ccagaccta	360
40	cacctgcaac	gtagatcaca	agcccagcaa	caccaagagc	gcaaatgttg	tgtcgag	417

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

45 <213> alfa-B.pertussis 1

<400> 17

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

ES 2 635 497 T3

<210> 18
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> alfa-B.pertussis 2

5

<400> 18

```

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

10

15

20

25

<210> 19
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> alfa-B.pertussis 3

30

<400> 19

```

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

35

40

45

50

<210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> alfa-B.pertussis 4

55

<400> 20

60

65

ES 2 635 497 T3

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

20 <210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> alfa-B.pertussis 5

25 <400> 21

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

45 <210> 22
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> neVHH1 original

50 <400> 22

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile
 1 5 10 15
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Glu Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys
 55 20 25 30
 Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 60 35 40 45
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 50 55

65 <210> 23
 <211> 59

ES 2 635 497 T3

<212> PRT
<213> neVHH1 clon 1

<400> 23

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

<210> 24
<211> 59
<212> PRT
<213> neVHH1 clon 2

<400> 24

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

<210> 25
<211> 59
<212> PRT
<213> neVHH1 clon 3

<400> 25

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

<210> 26
<211> 58
<212> PRT
<213> neVHH2 original

<400> 26

60

65

ES 2 635 497 T3

		Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ile	Phe	Ser	Ile	Asn	Ala	Met
		1				5					10					15	
5		Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Ala
					20					25					30		
		Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
				35					40					45			
10		Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn						
			50					55									
		<210> 27															
		<211> 58															
		<212> PRT															
15		<213> neVHH2 clon 1															
		<400> 27															
20		Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ile	Phe	Ser	Ile	Asn	Ala	Met
		1				5					10					15	
		Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Ala
					20					25					30		
25		Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
				35					40					45			
		Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn						
			50					55									
30		<210> 28															
		<211> 58															
		<212> PRT															
		<213> neVHH2 clon 2															
35		<400> 28															
40		Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ile	Phe	Ser	Ile	Asn	Val	Met
		1				5					10					15	
		Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Gly
					20					25					30		
		Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
				35					40					45			
45		Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn						
			50					55									
		<210> 29															
		<211> 58															
		<212> PRT															
50		<213> neVHH2 clon 3															
		<400> 29															
55		Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ile	Phe	Ser	Ile	Asn	Ala	Met
		1				5					10					15	
		Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Pro
					20					25					30		
60		Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
				35					40					45			
		Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn						
			50					55									
65		<210> 30															

ES 2 635 497 T3

<211> 78
 <212> PRT
 <213> línea germinal de VHH2

5 <400> 30

```

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

20 <210> 31
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> alfa-Tetanus 1

25 <400> 31

```

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

45 <210> 32
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> alfa-Tetanus 2

50 <400> 32

55

60

65

ES 2 635 497 T3

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

20 <210> 33
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> alfa-Tetanus 3

25 <400> 33

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

50 <210> 34
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> alfa-Tetanus 4

<400> 34

55
 60
 65

ES 2 635 497 T3

		Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ile	Phe	Ser	Ile	Asn	Ala	Met
		1				5					10					15	
5		Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Ala
					20					25					30		
		Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
				35					40					45			
10		Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met
			50					55					60				
		Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ala	Asp
		65					70					75					80
15		Thr	Ser	Pro	Pro	Arg	Tyr	Phe	Asp	Trp	Leu	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
						85					90					95	
		Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	
					100					105						110	
20	<210> 35																
	<211> 112																
	<212> PRT																
	<213> alfa-hsp70																
25	<400> 35																
		Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ile	Phe	Ser	Ser	Asn	Ala	Met
		1				5					10					15	
30		Gly	Trp	Ser	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Ala
					20					25					30		
		Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
				35					40					45			
35		Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	His	Leu	Gln	Met
			50					55					60				
		Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ala	Gly
		65					70					75					80
40		Asn	Thr	Met	Val	Arg	Gly	Val	Ile	Ile	Lys	Tyr	Arg	Phe	Asp	Tyr	Trp
						85					90				95		
		Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val
					100					105						110	
45																	
50																	
55																	
60																	
65																	

Reivindicaciones

1. Un método para la producción de un anticuerpo únicamente de cadena pesada V_H que comprende:

- 5
- (a) inmunizar una rata transgénica que expresa un locus de cadena pesada V_H heterólogo con un antígeno en el que:
- 10
- (i) el locus de cadena pesada V_H comprende una región variable que comprende al menos un segmento génico V_H de origen natural, al menos un segmento génico D, al menos un segmento génico J y al menos una región constante de cadena pesada, y en la que los segmentos génicos V, D y J derivan de un ser humano;
- (ii) cada región constante no se codifica a un dominio funcional C_{H1} ;
- 15
- (iii) un segmento génico V_H , un segmento génico D y un segmento génico J son capaces de recombinarse para formar una secuencia de codificación VDJ;
- (iv) el locus recombinado de cadena pesada V_H , cuando se expresa, es capaz de formar un anticuerpo únicamente de cadena pesada soluble que comprende un dominio de unión V_H específico de un antígeno soluble y una región efectora constante desprovista de un dominio funcional C_{H1} ;

- 20
- (b) aislar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo únicamente de cadena pesada V_H de las células que producen anticuerpos; y
- (c) producir el anticuerpo únicamente de cadena pesada V_H usando técnicas de ADN recombinante.

25

2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente clonar un locus V_H que codifica el dominio de unión V_H del anticuerpo únicamente de cadena pesada V_H y que expresa el dominio de unión V_H en un sistema de expresión bacteriano, de levadura, mamífero o alternativo.

30

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha rata transgénica ha sido modificada para tener una capacidad reducida para producir anticuerpos que incluyan cadenas ligeras.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los locis de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos a la rata se eliminan o silencian.

35

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el locus de cadena pesada V_H comprende más de un segmento génico V_H , más de un segmento génico D y más de un segmento génico J.

40

45

50

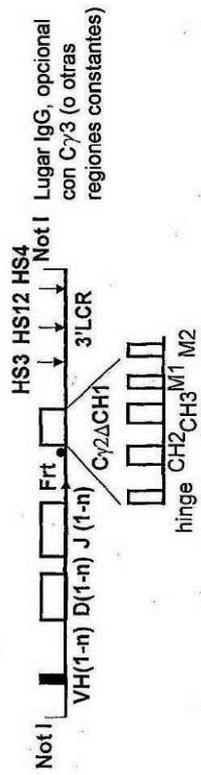
55

60

65

FIG. 1

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 bibliotecas de presentación de fagos

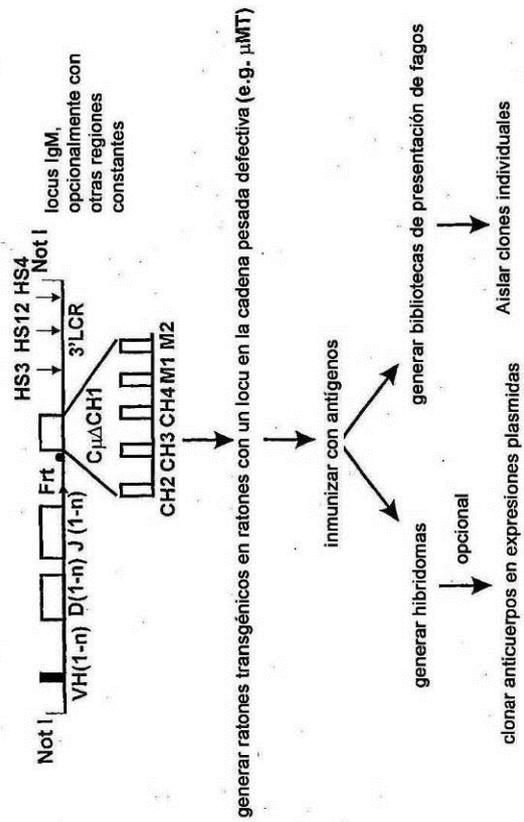
aislar clones individuales

generar hibridomas

opcional

clonar anticuerpos en expresiones plasmidicas

FIG. 2
Generación de cadena pesada solo IgM



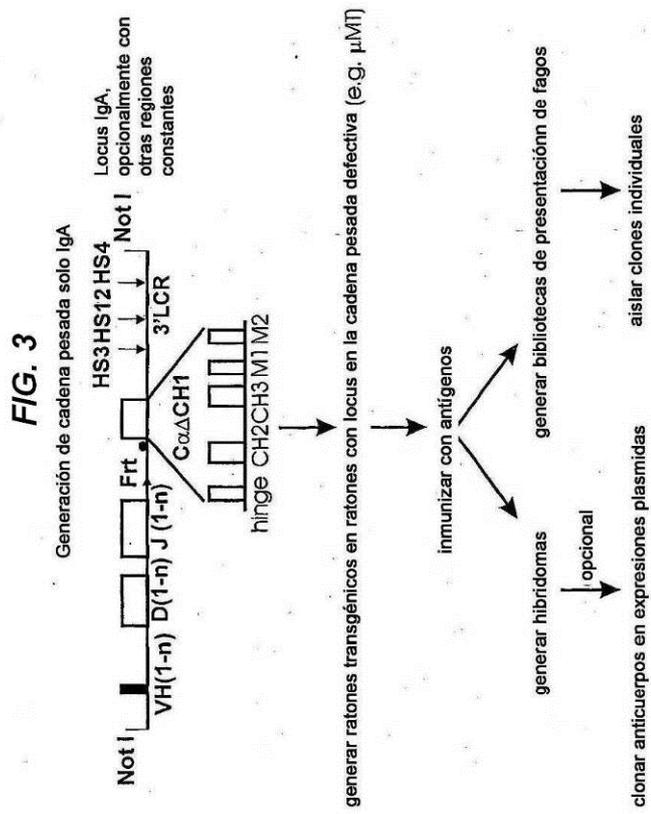


FIG. 4

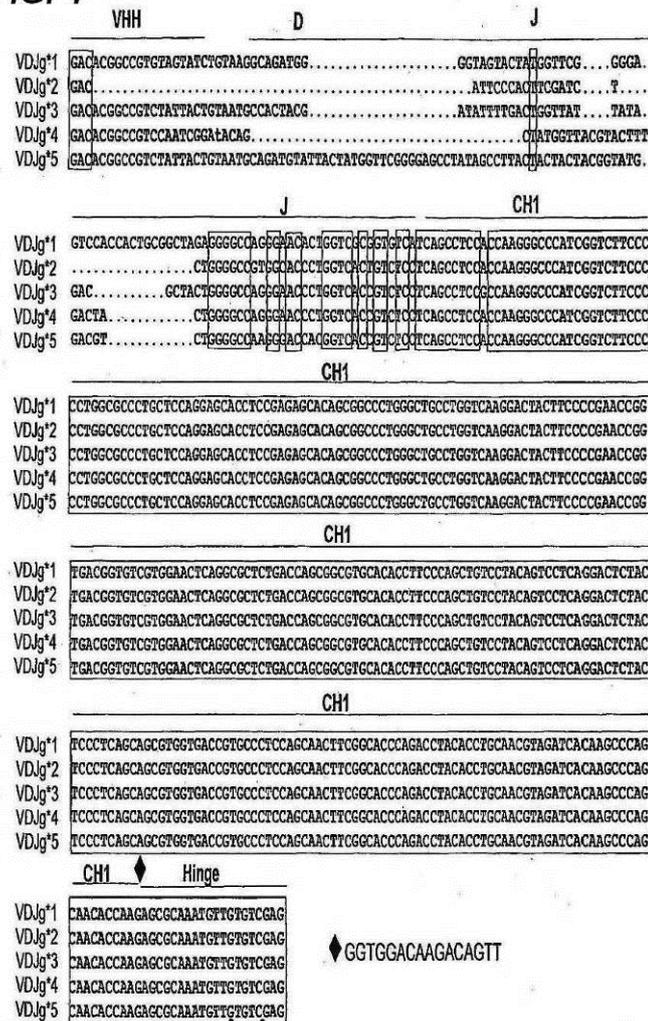
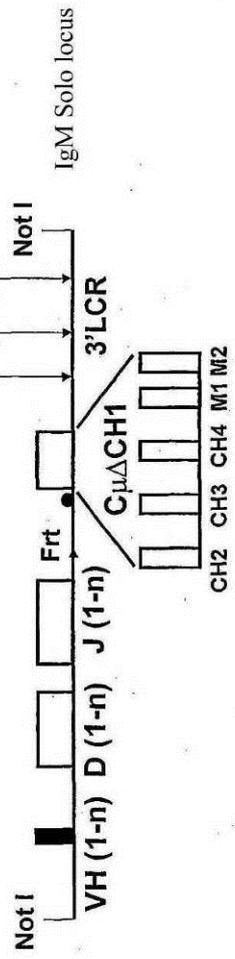


FIG. 6



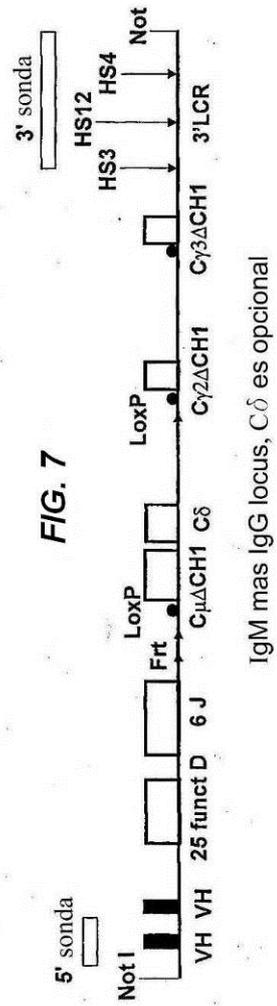


FIG. 8

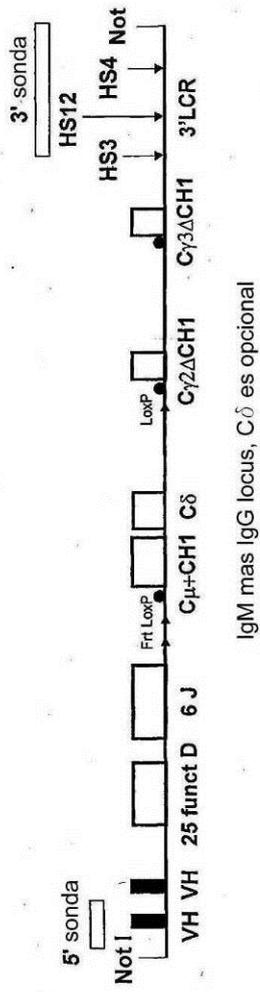


FIG. 9

CALENDARIO DE VACUNACIÓN
 s.c. inyecciones los días 0, 14, 28, 42
 i.p. or i.v. inyección el día 50
 día 56

Antígeno
 10-100 µg



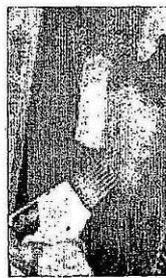
4-5 HLLdeltaMD-1.
 TMµ^c

celulas de bazo

celulas de mieloma Sp2.0-Ag14

Fusion + HAT

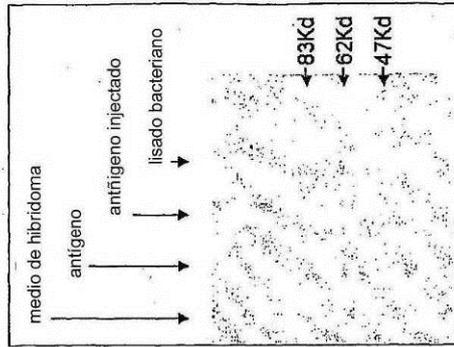
Híbridos



cultura en HAT

proyección

clonación



G18 HCab (IgG2 class)

VHH2

RLSCAASGSIFSNAWGWSRQAPGKQRELVAAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDAKNI...

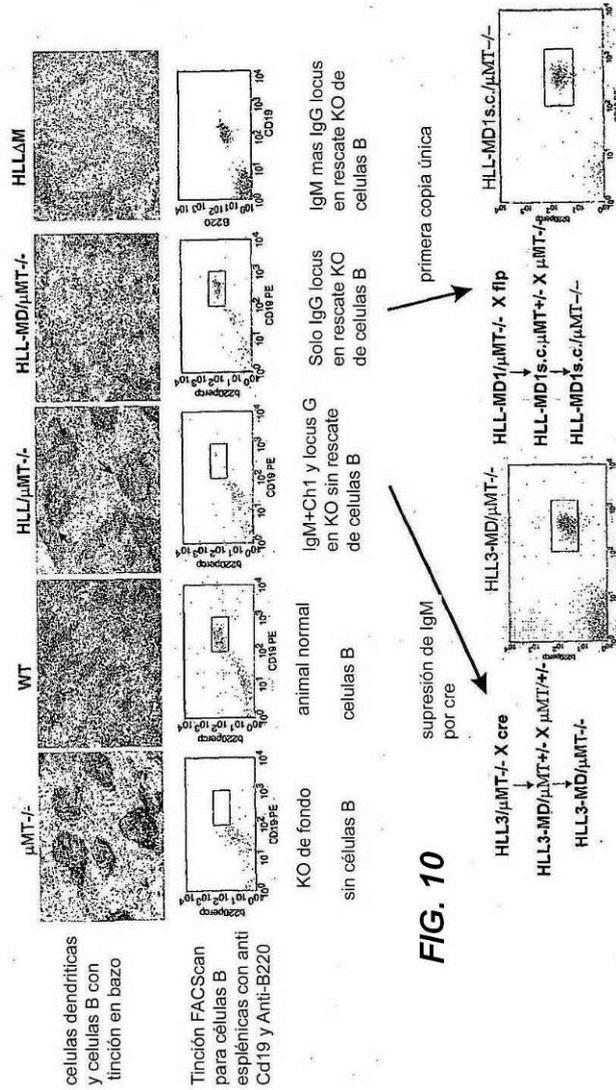
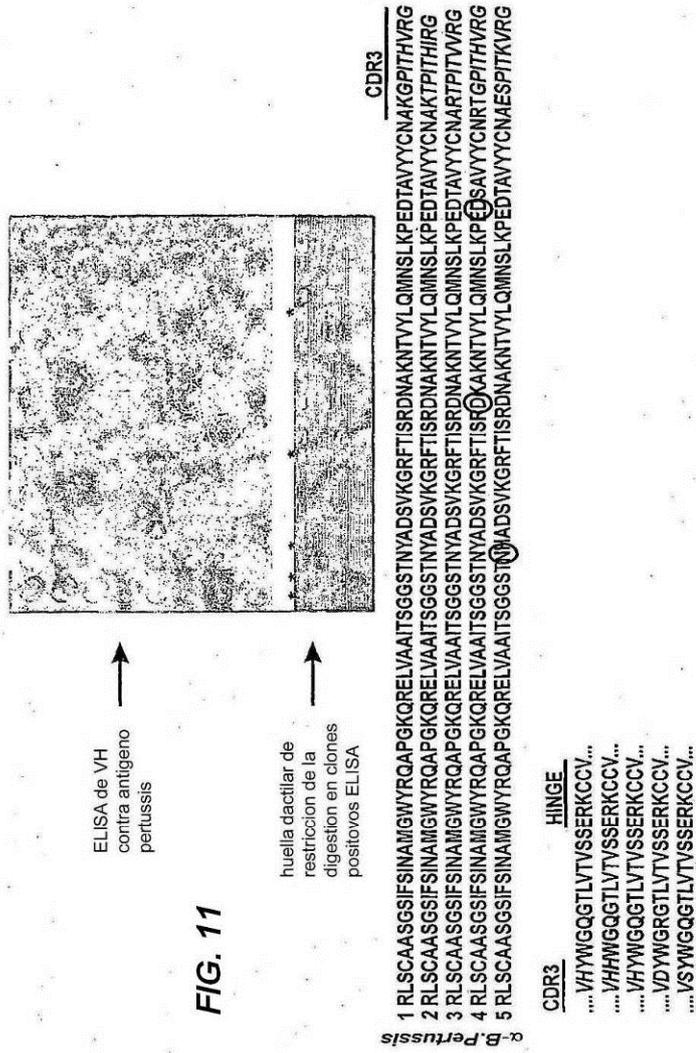


FIG. 10



na VHH1 RLSCAAAGFTLDYALQWFRQAEGEKEREVGSICSSDGGSTYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 1 RLSCAAAGFTLDYALQWFRQAEGEKEREVGSICSSDGGSTYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 2 RLSCAAAGFTLDYALQWFRQAEGEKEREVGSICSSDGGSTYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 3 RLSCAAAGFTLDYALQWFRQAEGEKEREVGSICSSDGGSTYADSVKGRFTISRDNAKN

CDR1 CDR2

ne VHH2 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 1 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 2 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 3 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKN

CDR1 CDR2

VHH2 germline VHH2 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCN.....
 CDR3

1 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNKGPITHVRG
 2 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNKPTPIHIRG
 3 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNARTPIITWVRG
 4 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNRTGPIITWVRG
 5 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNAESPITKVRG

1 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNAERAGDP.....
 2 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCGVWVFGELSD.
 3 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNAIDCWGSRW.
 4 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNAIDTSPPRYFDW

α-hsp70 RLSCAAAGSIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLLQWNSLKPEDTAVYYCNAIGNTMYRQVIL

CDR3 HINGE

1....VHYWGQGLTVVSSERKCCV...
 2....VHHWGGGLTVVSSERKCCV...
 3....VHYWGGGLTVVSSERKCCV...
 4....VDYWGGLTVVSSERKCCV...
 5....VSYWGGGLTVVSSERKCCV...

α-B Pertussis

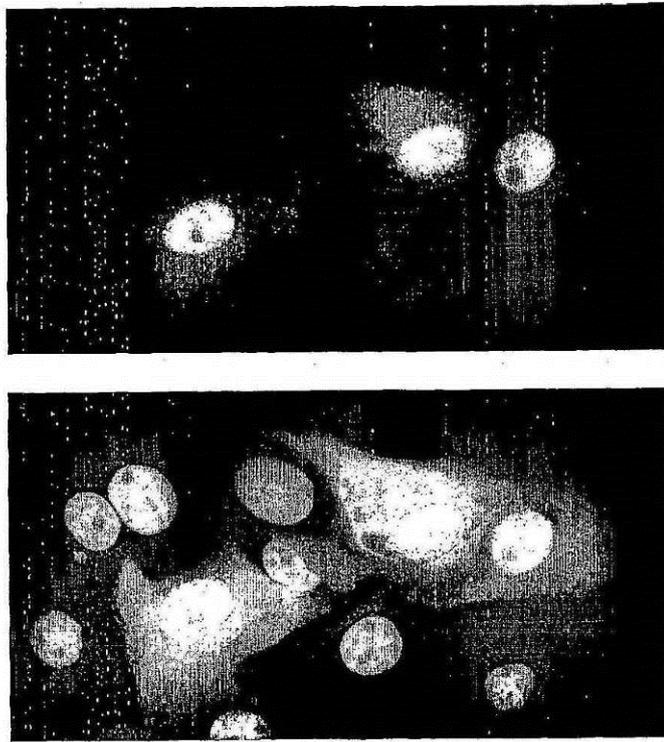
1....FDYWGQGLTVVSSERKCCV...
 2...WFDYWGQGLTVVSSERKCCV...
 3...YFDHWGRGLTVVSSERKCCV...
 4...LPFDYWGQGLTVVSSERKCCV...

α-Tetanus

α-hsp70KYRFDYWGQGLTVVSSERKCCV...

FIG. 12

FIG. 13



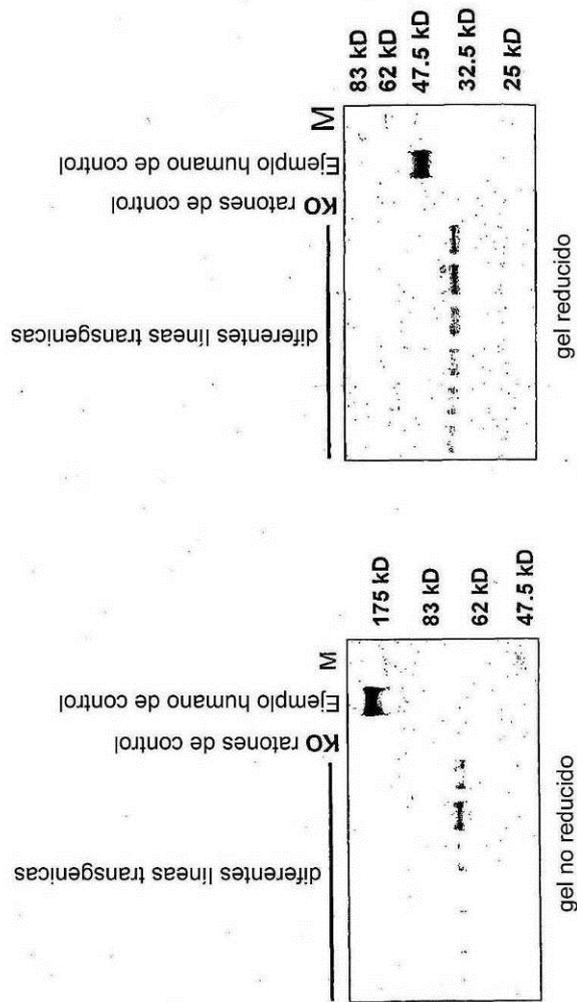


FIG. 14

FIG. 15

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

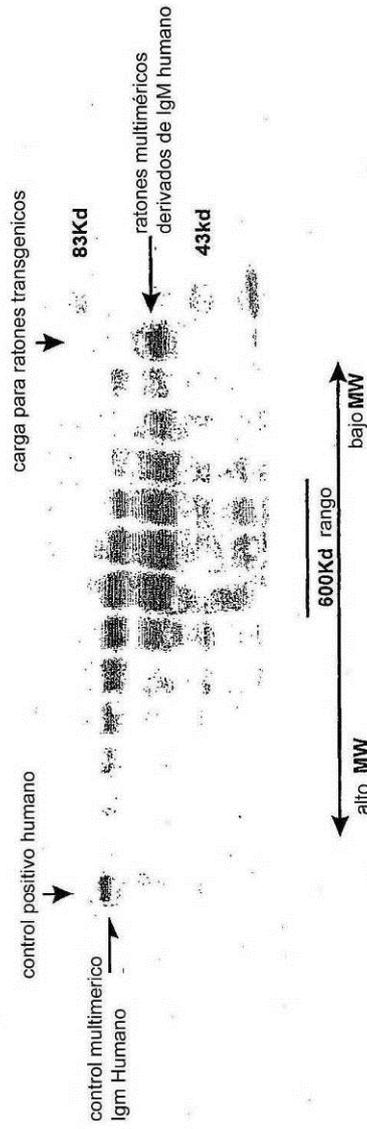


FIG. 16

ELISA de anticuerpos IgM y IgG de cadena sencilla generados contra TNF α humano

