

(11) Número de Publicação: **PT 1414858 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/79 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
A01K 67/27 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) **C07K 16/46** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2002.04.24	(73) Titular(es): ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM DR. MOLEWATERPLEIN 50 3015 GE ROTTERDAM NL
(30) Prioridade(s): 2001.04.24 GB 0110029	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.05.06	
(45) Data e BPI da concessão: 2007.04.04 005/2007	(72) Inventor(es): CHRISTOPHER PAUL MERCER GB
	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA A PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO EM MAMÍFEROS DE ANTICORPOS VHH DE CADEIA ÚNICA DE CAMELÍDEOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO EM MAMÍFEROS DE ANTICORPOS VHH DE CADEIA ÚNICA DE CAMELÍDEOS"

A presente invenção refere-se a um método para a formação de imunoglobulinas de cadeia única num mamífero. Em particular, a presente invenção refere-se a um método para a formação de anticorpos VHH de camelídeo de cadeia única num mamífero que sofre o processo de mudança de classe e maturação por afinidade verificada nas células B produtoras de anticorpos. São também descritos os anticorpos de cadeia única criados utilizando o método da presente invenção e as suas utilizações.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO EM MAMÍFEROS DE ANTICORPOS VHH DE CADEIA ÚNICA DE CAMELÍDEOS"

A presente invenção refere-se a um método para a formação de imunoglobulinas de cadeia única num mamífero. Em particular, a presente invenção refere-se a um método para a formação de anticorpos VHH de cadeia única de camelídeo num mamífero. São também descritos anticorpos de cadeia única criados utilizando o método da presente invenção e suas utilizações.

Antecedentes da invenção

O domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo compreende duas regiões separadas: um domínio variável da cadeia pesada (VH) e um domínio variável da cadeia leve (V_L : que pode ser V_{κ} ou V_{λ}). O próprio sítio de ligação do antigénio é formado por seis ansas de polipéptidos: três do domínio VH (H1, H2 e H3) e três do domínio V_L (L1, L2 e L3). Um reportório primário diverso de genes V que codificam os domínios VH e V_L é produzido pelo rearranjo combinatório dos segmentos do gene. O gene VH é produzido através da recombinação de três segmentos de genes, VH, D e J_H . Nos humanos, existem, aproximadamente, 51 segmentos VH funcionais (Cook e Tomlinson (1995) *Immunol Today*, **16**:237), 25 segmentos D funcionais (Corbett *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* **268**:69 e 6 segmentos J_H funcionais (Ravetech *et al.* (1981) *Cell*, **27**:583), dependendo do haplotipo. O segmento VH codifica a região da cadeia polipeptídica que forma a primeira e

a segunda ansas de ligação do antigénio do domínio VH (H1 e H2), enquanto que os segmentos VH, D e J_H combinam-se para formar a terceira ansa de ligação do antigénio do domínio VH (H3). O gene V_L é produzido através da recombinação de apenas dois segmentos de genes, VL e JL. Em humanos, existem aproximadamente 40 segmentos V_k funcionais (Schäble e Zachau (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **374**:1001), 31 segmentos V_λ funcionais (Williams et al. (1996) *J. Mol. Biol.* **264**:220; Kawasaki et al. (1997) *Genome Res.*, **7**:250), 5 segmentos J_k funcionais (Hieter et al. (1982) *J. Biol Chem.*, **257**:1516) e 4 segmentos J_λ funcionais (Vasicek e Leder (1990) *J. Exp. Med.*, **172**:609), dependendo do haplotipo. O segmento VL codifica a região da cadeia polipeptídica que forma a primeira e a segunda ansa de ligação do antigénio do domínio V_L (L1 e L2), enquanto que os segmentos V_L e J_L se combinam para formar a terceira ansa de ligação do antigénio do domínio V_L (L3). Crê-se que os anticorpos seleccionados a partir deste repertório principal são suficientemente diversos para se ligarem a quase todos os antigénios com, pelo menos, afinidade moderada. São preparados anticorpos de alta afinidade por "maturação por afinidade" dos genes rearranjados, nos quais são criadas mutações pontuais, e seleccionados através do sistema imunitário com base na ligação melhorada.

O locus da cadeia pesada contém um grande número de genes da cadeia variável (VH; na realidade, genes não completos, mas compreendendo um primeiro exão codificante mais o sítio de início transcricional) que são recombinados em duas regiões codificantes curtas D e J (conhecida como recombinação VDJ) que procede os exões que codificam para a região constante da cadeia pesada C_μ, para dar origem a um gene completo da cadeia pesada do anticorpo conhecido como IgM. Subsequentemente, realiza-se uma mudança de classe quando a parte variável é recombinada com

outra região constante que está localizada a jusante da região constante do IgM para dar origem a IgD, IgG, IgA e IgE (codificada pelos exões dos vários C δ , C γ , C α , C ϵ localizados a jusante do gene para C μ . As regiões constantes intervenientes são eliminadas no processo. Ocorre um processo semelhante no loci do gene leve, primeiro no locus κ , e quando este não conduz a um anticorpo eficiente, no locus λ (para revisão ver Rajewski, K., *Nature* 381, p751-758, 1996; para uma revisão extensa, ver o livro de texto *Immunobiology*, Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Capra. J., *Current Biology Publications/Churchill Livingstone/Garland Publishing*, quarta edição, 1999, ISBN 0-8153-3217-3).

Os camelídeos (camelos, dromedários e lamas) contêm, adicionalmente aos anticorpos normais de cadeia pesada e leve (2 cadeias leves e 2 cadeias pesadas num anticorpo), anticorpos de cadeia única (contendo apenas cadeias pesadas). Estes são codificados através de um conjunto distinto de segmentos de VH referidos como genes VHH. A ligação do antigénio para os anticorpos de cadeia única é diferente daquela observada com anticorpos convencionais, mas a afinidade elevada é alcançada do mesmo modo, *i. e.* através de hipermutação da região variável e selecção das células que expressam tais anticorpos de alta afinidade (maturação por afinidade). Os VH e VHH estão disseminados no genoma (*i. e.* aparecem misturados entre cada um). A identificação de um segmento D idêntico num segmento de ADNc de VH ou VHH sugere a utilização comum do segmento D para VH ou VHH. Os anticorpos contendo VHH natural carecem do domínio C $H1$ inteiro da região constante da cadeia pesada. O exão que codifica para o domínio C $H1$ está presente no genoma mas é sujeito a excisão, devido à perda de uma sequência aceitadora de excisão funcional no lado 5' do exão C $H1$. Como resultado a região VDJ é

sujeita a excisão no exão C_{H2}. Quando um VHH é recombinado para tais regiões constantes (C_{H2}, C_{H3}) é preparado um anticorpo que actua como um anticorpo de cadeia única (*i. e.* um anticorpo de duas cadeias pesadas sem uma interacção com uma cadeia leve). A ligação de um antigénio é diferente daquela verificada com um anticorpo convencional, mas a elevada afinidade é alcançada do mesmo modo, *i. e.* através de hipermutação da região variável e selecção das células expressando tais anticorpos de alta afinidade.

A estrutura dos domínios VH isolados foi determinada utilizando técnicas de cristalografia por RMN e raios X (Spinell *et al*, (1996), *Nat Structural Biol.* 3, 752). Os dados evidenciam que o enrolamento da Imunoglobulina está bem preservado nos domínios VHH de Camelídeo. São empacotadas duas folhas beta uma contra a outra (uma com quatro e uma com cinco cadeias beta) e estabilizadas através de uma ponte persulfureto do intradomínio conservado entre C22 e C92. O lado do domínio VHH de camelo correspondendo à interface VL do VH normal num Fv possui uma arquitectura bastante diferente. Quando comparados com o VH humano, são localizadas quatro substituições de aminoácidos nesta região.

A partir de uma pesquisa de todas as estruturas das ansas de ligação do antigénio de VH humano e de murganho, é evidente que existe apenas um número restrito de conformações possíveis. São descritas três e quatro conformações diferentes para a primeira e segunda ansa de ligação do antigénio, respectivamente. Estas estruturas canónicas são determinadas pelo comprimento da ansa e a presença de resíduos particulares em posições chave. A ansa H3 é extremamente variável em comprimento e em sequência (Wu *et al* (1993) *Proteins: structure,*

funct and genet., 16, 1). Surpreendentemente, a ansa de ligação do antigénio dos domínios VH de camelo apresenta um desvio das definições de ansa canónica dos domínios VHH de humano e de murganho. Este desvio pode não ser previsível uma vez que o comprimento da ansa e os resíduos nas posições chave são muito semelhantes entre VH de camelo e VH humano. As estruturas da ansa canónica adicionais nos domínios VH de camelo tornam o reportório estrutural do seu paratopo maior que o dos domínios VH em fragmentos Fv a partir de anticorpos convencionais. Além disso, a região hipervariável à volta da primeira ansa de ligação do antigénio é alargada quando comparada com anticorpos humanos ou de murganho. Julga-se que a extensão da primeira região hipervariável e superfície de ligação alargada do antigénio concomitante comparada com aquela de um VH num anticorpo convencional compensa, em parte, a ausência de um domínio V_L (Reichmann, L. & Muyltermans, S (1999), 231 25-38).

Um único domínio do anticorpo VHH de camelídeo além de ser mais apropriado para análise estrutural do que as moléculas de anticorpo de cadeia pesada e leve mais alargadas, também proporciona uma unidade de ligação ao antigénio pequena e eficiente. Tal anticorpo possui muito e variado potencial terapêutico. Adicionalmente, foi verificado que os anticorpos de cadeia única de camelídeo podem ligar-se a antigénios que estão inacessíveis a anticorpos possuindo cadeias pesadas e leves. Julga-se que esta capacidade é devida à presença de uma terceira ansa hipervariável grande, protuberante, de 10 aminoácidos ou mais que se pode inserir em cavidades das superfícies dos antigénios. Isto é especialmente significativo uma vez que o sítio catalítico de um enzima está frequentemente localizado na sua maior cavidade na superfície proteica. (Ladowski, R. A (1996). *Protein Science* 5, 2438). Tais sítios não são,

normalmente, imunogénicos para os anticorpos convencionais (Novotny, J *et al*, (1986) *Proc Nat Acad Sci USA*, 83, 226). Na estrutura do cAb-Lys3 VHH de camelo, a ansa H3 com 24 resíduos penetra profundamente no sítio activo da lisozima (Transue, T. R *et al* (1998) *Prot: Structure, Funct and Genet*, 32, 515), evidenciando que os anticorpos de cadeia pesada de camelo possuem potencial para formar inibidores enzimáticos específicos.

Recentemente, domínios VHH isolados de camelídeos foram criados em bactérias (Riechmann, L *et al*. *Journal of Immunological Methods* 231 (1999), 25-38). Contudo os sistemas de expressão bacteriana possuem a desvantagem de não realizarem modificações pós-tradução. Tais modificações, em particular eventos de glicosilação, são cruciais para o funcionamento eficaz dos anticorpos, particularmente num ambiente *in vivo*.

No mesmo estudo, os genes para os domínios VHH de camelo foram inseridos em vectores de expressão e expressos em células Cos para criarem proteínas multi-domínio. Num exemplo, apenas um anticorpo intacto da única cadeia pesada foi criado através da clonagem de uma VHH particular de camelo em frente dos domínios da função de articulação e efectora do IgG1 humano. A expressão em células Cos possui a vantagem sobre os sistemas de expressão bacteriana nos quais ocorrem eventos de modificação pós-tradução nestas células. Consistente com isto foi a verificação de que estes anticorpos eram completamente activos na ligação ao antigénio. O ADN para a formação destas construções é, geralmente, isolado a partir de anticorpos maturados (*i. e.* aqueles que sofreram maturação por afinidade) criados a partir de células B. Apesar destes anticorpos de cadeia única, expressos em células de mamíferos, num ambiente *in vitro* se

poderem ligar a um ou mais antigénios, estes não podem sofrer processos de mudança de classe (isotipo) e maturação por afinidade (hipermutação). Assim, os anticorpos de cadeia única, expressos nas células Cós, não sofrem o processo de evolução dos anticorpos como os anticorpos que ocorrem naturalmente, criados num mamífero. É este processo de evolução do anticorpo que resulta na produção de anticorpos específicos que se podem ligar com elevada afinidade. Assim, existe uma necessidade na técnica de um método que permita a formação de anticorpos VHH de cadeia única num mamífero, de modo que o processo normal de evolução do anticorpo se possa realizar.

Adicionalmente, os anticorpos de cadeia única de Camelídeos foram também seleccionados e expressos utilizando tecnologia de apresentação de fagos. (Riechmann, L. & Davies, S. J. *Biomol. NMR*, 6, 141). No entanto, novamente, as construções de anticorpos são criadas a partir de ácidos nucleicos isolados a partir de células B maturadas ou fígado e, deste modo, tal como no exemplo anterior, os anticorpos expresso não sofrem mudança de classe e hipermutação somática (mutação por afinidade) que é necessária para a preparação de anticorpos específicos que se ligam ao seu antigénio com selectividade e alta afinidade.

Os presentes inventores aperceberam-se que se pudessem compreender o mecanismo através do qual as moléculas de anticorpo de cadeia única de camelídeo se desenvolvem (através de mudança de classe e maturação por afinidade) durante o desenvolvimento precoce do anticorpo em células B, então este sistema pode ser recriado *in vivo*. Isto permitiria a formação de largas quantidades de um anticorpo de cadeia única desenvolvido para aplicações estruturais, terapêuticas e de diagnóstico.

Sumário da Invenção

As moléculas de anticorpo que compreendem as cadeias pesadas e leves mudam de classes durante o desenvolvimento das células B. O desenvolvimento de células B na medula óssea expressa, em primeiro lugar, IgM ligado à membrana. Durante o desenvolvimento é expresso IgG secretor. No caso de anticorpos possuindo as cadeias leves e pesadas, uma região J é recombinada numa região C μ para preparar um IgM compreendendo as regiões VH, D e J. A célula produzindo IgM madura posteriormente através de mudança para uma região constante diferente da cadeia pesada, para produzir, por exemplo, IgA. O mecanismo de recombinação envolve uma pseudo-cadeia leve que se recombina com a parte VH do IgM, estando presente a pseudo-cadeia leve durante a linhagem precoce da célula B.

Os presentes inventores aperceberam-se que compreendendo o mecanismo através do qual os anticorpos de cadeia única mudam de classes e/ou sofrem maturação por afinidade (evolução do anticorpo) durante o desenvolvimento de pré-célula B, permitiria que fosse criado um locus VHH como aqui definido, que resultou na preparação de um anticorpo específico VHH de cadeia única que sofre um processo de evolução semelhante ou o mesmo do que os anticorpos de camélideo produzidos no seu ambiente nativo.

Assim, num primeiro aspecto, a presente invenção proporciona um método para a preparação de um anticorpo VHH de cadeia pesada única, num mamífero transgênico não humano compreendendo o passo da expressão de um locus VHH heterólogo de cadeia pesada nesse mamífero, como definido na reivindicação 1.

Num aspecto adicional, a presente invenção proporciona um método para preparação de um anticorpo VH de cadeia pesada única de camelo num mamífero transgénico não humano, compreendendo o passo de expressar um locus VH de cadeia pesada de camelídeo nesse mamífero, como definido na reivindicação. São definidas as características preferidas da invenção nas reivindicações dependentes.

De um modo preferido, o locus VHH da cadeia pesada ou o locus VH de cadeia pesada de camelídeo compreende, pelo menos, uma sequência recombinante (rss) capaz de recombinar uma região J directamente com um gene constante C γ da cadeia pesada.

De um modo preferido, o locus VH da cadeia pesada de camelídeo compreende, pelo menos, uma região D de origem humana e, pelo menos, uma região J de origem humana.

Os presentes inventores demonstraram que no caso de anticorpos de cadeia pesada única a mudança de classe ocorre para formar scAb (uma cadeia polipeptídica do anticorpo de cadeia pesada única completa). Este mecanismo envolve a recombinação da região J directamente com a região do gene C γ da cadeia pesada da região constante da cadeia pesada, de um modo preferido, na medula óssea resultando na formação de um scIgG (molécula IgG de cadeia única). A presença de uma sequência sinal de recombinação (rss) na construção permite a ligação da região J directamente com o gene C γ .

No contexto da presente invenção, o mamífero não é um humano. O mamífero transgénico é, vantajosamente, mais pequeno que um camelídeo e mais fácil de manter e imunizar com

antigénios desejados. De um modo ideal, o mamífero transgénico é um roedor, tal como um coelho, cobaia, rato ou murganho. Os murganhos são especialmente preferidos. Podem ser também utilizados mamíferos alternativos, incluindo cabras, ovelhas, gatos, cães e outros animais domésticos ou selvagens.

De um modo vantajoso os loci da cadeia pesada endógenos para o mamífero são eliminados ou silenciados quando um anticorpo de cadeia única é expresso de acordo com o método da presente invenção. São descritas técnicas apropriadas para os últimos nos documentos W000/26373 ou W0096/33266 e (Li e Baker (2000) *Genetics* 156(2):809-821; Kitamura e Rajewsky (1992); Kitamura e Rajewsky, (1992) *Nature* 356, 154-156).

O termo, um "anticorpo VHH de cadeia pesada, única", significa uma molécula de anticorpo que é composta apenas de cadeias pesadas (geralmente duas) e não compreende quaisquer cadeias leves. Cada cadeia pesada compreende uma região variável (codificada pelos exões VHH, D e J) e uma região constante. A região constante compreende ainda um número de CH (domínios constantes da cadeia pesada), compreendendo, de um modo vantajoso, dois: um domínio CH2 e um domínio CH3, codificados por um gene da região constante. Um anticorpo VHH de cadeia única, como aqui definido, não possui um domínio CH1 funcional e também carece de um domínio CH4 funcional. É a falta de um domínio CH1 funcional (que nos anticorpos convencionais possui o local de ancoragem para o domínio constante da cadeia leve) que é responsável pela incapacidade dos anticorpos de cadeia pesada se associarem com as cadeias leves para formar anticorpos convencionais.

O termo "um anticorpo VH de cadeia pesada única de camelídeo", significa uma molécula de anticorpo que é composta apenas de cadeias pesadas (geralmente duas) e não compreende quaisquer cadeias leves. Cada cadeia pesada compreende uma região variável (codificada por "um/uns exão/exões VH de camelídeo", exão/exões D e J) e uma região constante. A região constante compreende, pelo menos, um gene da região constante. Cada gene da região constante compreende um número de exões da região constante, cada exão codificando uma região constante do domínio CH. De um modo geral, a região constante compreende dois domínios CH: um domínio CH2 e um domínio CH3. Um anticorpo VH de cadeia única de camelídeo como aqui definido não possui um domínio funcional CH1, adicionalmente, também carece de um domínio CH4 funcional. É a falta de um domínio CH1 funcional (que nos anticorpos convencionais possui um local de ancoragem para o domínio constante da cadeia leve) que é responsável pela incapacidade dos anticorpos de cadeia pesada para se associarem com cadeias leves para formar anticorpos convencionais.

No contexto da presente invenção, o termo "heterólogo" significa um locus VHH de cadeia pesada como aqui descrito que não é endógeno desse mamífero. Isto é, no caso em que o mamífero é um camelídeo *i.e* um camelo ou um lama, então a expressão é de um locus VHH que não é encontrada normalmente num camelo ou lama, respectivamente.

No contexto da presente invenção, um "locus VHH da cadeia pesada" é compreendido de uma região VHH, uma "região J", uma "região D" e uma "região constante da cadeia pesada". Cada região VHH compreende um exão VHH, cada região J um exão J e cada região D um exão D, e cada região constante da cadeia pesada compreende um ou mais genes da região constante da cadeia

pesada. Adicionalmente, cada região VHH não compreende essencialmente um ou mais exões VH funcionais.

No contexto da presente invenção, uma "região/exão VHH" descreve uma sequência que codifica VHH que ocorre naturalmente, tal como encontrada nos camelídeos e qualquer homólogo, derivado ou seu fragmento desde que o exão/região resultante recombine com um exão/região D, um exão/região J e uma região constante da cadeia pesada (que compreende vários exões) de acordo com a presente invenção para criar um anticorpo VHH de cadeia única como aqui definido, quando o ácido nucleico é expresso.

Um "locus VH da cadeia pesada de camelídeo" é compreendido de uma "região VH de camelídeo" como aqui definido, uma "região J", uma "região D" e uma "região constante da cadeia pesada". Cada região VH de camelídeo compreende um exão VH de camelídeo, cada região J um exão J e cada região D um exão D e cada região constante da cadeia pesada compreende um ou mais exões da região constante da cadeia pesada.

No contexto da presente invenção, uma "região/exão VH de camelídeo" descreve uma sequência que codifica VH que ocorre naturalmente derivada de mamíferos que não Camelídeos, por exemplo, um humano que foi mutado de modo tal que a sequência é a mesma do que a do exão do Camelídeo. Um exão VH de camelídeo também inclui neste âmbito qualquer homólogo, derivado ou fragmento do exão desde que o exão/região possa recombinar com a região/exão D, região/exão J e uma região constante da cadeia pesada compreendendo um ou mais exões para criar um anticorpo VH de cadeia única como aqui definido.

Os exões VHH e VH podem ser derivados de fontes que ocorrem naturalmente ou podem ser sintetizados utilizando métodos familiares para os especialistas na técnica e aqui descritos.

Tal como no contexto da presente invenção os termos "um exão D" e "um exão J" incluem sequências que ocorrem naturalmente de exões D e J que são verificadas em Camelídeos ou outras espécies de mamíferos. Os termos exão D e exão J também incluem dentro do seu âmbito derivados, homólogos e seus fragmentos tal como o exão resultante pode recombinar com os componentes restantes de um locus do anticorpo de cadeia única como aqui descrito (quer VH ou VHH de camelídeo) para criar um anticorpo de cadeia única como aqui descrito. Os exões/regiões D e J podem ser derivados de fontes que ocorrem naturalmente ou estes podem ser sintetizados utilizando métodos familiares dos especialistas na técnica e aqui descritos.

Adicionalmente, um locus do anticorpo de cadeia pesada (quer VHH ou VH de camelídeo) compreende uma região de ADN codificando um polipéptido constante da cadeia pesada (uma região constante da cadeia pesada).

Cada região constante da cadeia pesada compreende, essencialmente, pelo menos, uma região constante do gene da cadeia pesada que é $C\gamma$, de modo que possa ocorrer a formação de IgG de cadeia única. Cada gene constante da cadeia pesada compreende um ou mais exões constantes da cadeia pesada que podem ser originários ou não de Camelídeo e são seleccionados a partir do grupo consistindo de $C\delta$, $C\gamma_{1-4}$, $C\epsilon$, e $C\alpha_{1-2}$. De um modo preferido, pelo menos, um exão da região constante da cadeia pesada num locus do anticorpo de cadeia pesada é de origem

humana, de murganho ou coelho. De um modo vantajoso, pelo menos, um exão C γ da cadeia pesada é de origem humana. Quando expressa, a região constante da cadeia pesada carece de um domínio CH1 e CH4 funcional que estão presentes em anticorpos de cadeia dupla. De um modo vantajoso, apenas um ou mais genes C γ 2 e/ou C γ 3 com domínios CH1 (não-funcionais) modificados estão presentes na região constante da cadeia pesada.

Um "exão da região constante da cadeia pesada" ("exão C_H"), como aqui definido, inclui as sequências de C_H que ocorrem naturalmente, tais como aquelas verificadas em camelídeos ou humanos ou outros mamíferos incluindo coelhos e murganhos. O termo "exão C_H" também inclui, dentro do seu âmbito, derivados, homólogos e seus fragmentos até ao ponto de o exão C_H ser capaz de formar um anticorpo funcional de cadeia pesada única (compreendendo quer regiões codificadas por exões VHH ou exões VH de camelídeos) como aqui definido quando é um componente de uma região constante da cadeia pesada.

De um modo geral, os genes C_H compreendem três ou quatro exões (C_H1-C_H4) que codificam domínios diferentes de cada polipéptido constante da cadeia pesada, em geral com dois polipéptidos constituindo um anticorpo de cadeia pesada única, como aqui descrito. Contudo, como discutido anteriormente, os anticorpos VHH e VH de cadeia única de camelídeos não possuem um CH1 funcional (contendo a região de ancoragem do domínio da cadeia leve) ou CH4. Assim, os loci dos anticorpos de cadeia pesada simples possuem um ou mais genes que não expressam os domínios funcionais CH1 ou CH4. Isto pode ocorrer através de mutação, substituição por eliminação ou outro tratamento dos exões CH1 e CH4 do gene da região constante da cadeia pesada.

De um modo preferido, um locus VHH da cadeia única compreende, pelo menos, um gene constante da cadeia pesada em que o ácido nucleico que codifica o domínio CH1 e CH4 é mutado, eliminado ou substituído ou tratado de outro modo de modo a que a cadeia pesada constante dos anticorpos VHH de cadeia única expressos como aqui definido, não contenha um domínio CH1 funcional e um domínio CH4.

Para evitar a dúvida, o termo "proveniente de coelho" ou "origem humana" como anteriormente referido, significa que a sequência do ácido nucleico de um ou mais exões compreendendo um locus do anticorpo de cadeia pesada (quer VH ou VHH de camelídeo) é o mesmo do que um ou mais exões do locus do anticorpo que ocorre naturalmente em coelhos ou humanos. Um especialista na técnica apreciará que estes exões possam ser derivados de fontes naturais ou possam ser sintetizados utilizando métodos familiares dos especialistas na técnica e aqui descritos.

Cada VHH ou "região VH de camelídeo" compreende um exão VHH ou "exão VH de camelídeo", respectivamente. Cada região J e região D compreende um exão J e D, respectivamente. De um modo preferido, cada locus da cadeia pesada compreende um ou mais do que um, mais do que 2, mais do que 3, mais do que 4, mais do que 5, mais do que 6 exões/regiões J e/ou D. De um modo mais preferido, um locus VHH ou locus VH de camelídeo compreende o mesmo número de exões/regiões VHH e/ou exões/regiões D e/ou exões/regiões J como aqueles encontrados num Camelídeo.

De um modo vantajoso, o método da presente invenção é para a preparação de um anticorpo de cadeia única através da

expressão de um locus da cadeia pesada VHH ou locus da cadeia pesada VH de camélídeo compreendendo um ou mais exões constantes da cadeia pesada de origem humana, de coelhos ou murganhos como aqui definido. Isto é, de um modo preferido, um anticorpo de cadeia pesada única, é criado através da expressão de um locus de camélídeo/humano híbrido ou um locus de camélídeo/coelho híbrido ou um locus de camélídeo/murganho híbrido. Numa forma de realização especialmente preferida deste aspecto da invenção, o locus da cadeia pesada única, expresso de acordo com o método da presente invenção compreende todos os exões VHH originários de Camélídeo e todos os exões D, J e da região constante da cadeia pesada de origem humana, originários de coelhos ou ratos. Numa forma de realização preferida posterior, o locus da cadeia pesada única, expresso de acordo com o método da presente invenção compreende todos os exões VH de camélídeo e todos os exões D, J e das regiões constantes da cadeia pesada de origem humana, ou originários de coelhos ou murganhos.

De um modo preferido, o locus da cadeia pesada compreende ainda um ou mais sítios de cassete permitindo a cassete directa do locus de um vector para o outro. De um modo vantajoso, um ou mais sítios de cassetes estão localizados na sequência líder 5' do locus e/ou na região 3' não traduzida do locus. De um modo preferido, um ou mais sítios de cassetes estão localizados em ambas a sequência líder 5' do locus e na região 3' não traduzida do locus. A cassete directa permite, por exemplo, movimento do ácido nucleico num vector de expressão bacteriano para a adição de marcadores e sinais.

Esta abordagem de formação de anticorpos híbridos, única de cadeia pesada como descrito anteriormente, pode ser de utilização particular na formação de anticorpos para utilização

terapêutica humana tão frequentemente como a administração de anticorpos a uma espécie de vertebrados que é de origem diferente da fonte dos anticorpos, resulta no início de uma resposta imunológica contra esses anticorpos administrados. Os anticorpos híbridos de cadeia única de camélídeo/humano são, portanto, potencialmente menos imunogênicos que os anticorpos de cadeia única de Camélídeo quando administrados a um humano.

No contexto da presente invenção, a mesma inclui, substancialmente, o mesmo. Entende-se por substancialmente o mesmo, superior a 80% de homologia, de um modo preferido superior a 85%, 90%, 95% de homologia. De um modo mais preferido, superior a 96, 97, 98% de homologia. De um modo muito preferido, entende-se por substancialmente o mesmo, que a região VH mutada humana é superior a 99% de homologia com uma região VHH de Camélídeo.

Os anticorpos produzidos de acordo com o método da presente invenção possuem a vantagem sobre aqueles da técnica anterior de que estes sofreram um processo de mudança de classe que é semelhante ou o mesmo que aquele do anticorpo de cadeia única de Camélídeo criado no seu ambiente normal. Os anticorpos obteníveis de acordo com os métodos da presente invenção podem ser anticorpos monoclonais ou policlonais. De um modo vantajoso, estes são anticorpos monoclonais. Os anticorpos podem ser criados utilizando métodos conhecidos dos especialistas na técnica. De um modo vantajoso, os hibridomas podem ser utilizados para criar anticorpos monoclonais. As técnicas serão familiares para os especialistas na técnica e são aqui descritas.

Ainda num aspecto adicional, a presente invenção proporciona um vector compreendendo um locus VHH da cadeia pesada de acordo com a presente invenção.

Ainda num aspecto adicional, a presente invenção proporciona um vector compreendendo uma cadeia pesada VH de camelídeo de acordo com a presente invenção.

Serão familiares vectores apropriados para os especialistas na técnica. De um modo vantajoso, é preferido um vector apropriado para inserção de grandes quantidades de ácido nucleico, suficiente para codificar um locus completo da cadeia pesada da imunoglobulina. Os vectores apropriados incluem cromossomas artificiais de levedura e bacterianos, tais como YACs e BACs. De um modo vantajoso, os vectores são construídos de modo que possa ser realizado a cassette directa do ácido nucleico que codifica um locus do anticorpo única de cadeia pesada como aqui definido num vector diferente. Por exemplo, a codificação do ADNc da transcriptase reversa para um anticorpo de cadeia pesada única pode ser "casseted" num vector de expressão bacteriana permitindo a adição de marcações, sinais ou epitopos.

Ainda num aspecto posterior, a presente invenção proporciona uma célula hospedeira transformada com um locus VHH de acordo com a presente invenção.

No contexto da presente invenção, o termo "mamífero transgénico" não inclui dentro do seu âmbito um humano transgénico. De um modo preferido, um mamífero transgénico é inferior a um Camelídeo. De um modo preferido, é seleccionado a partir do grupo consistindo de: um murganho, rato, cobaia, hamster, macaco e coelho. De um modo vantajoso, é um murganho.

De um modo vantajoso, os loci da cadeia pesada endógenos para o animal transgênico são eliminados ou silenciados num mamífero transgênico utilizado no método de acordo com a presente invenção. Técnicas apropriadas para os últimos são descritas nos documentos WO00/26373 ou WO96/33266 e (Li e Baker (2000) *Genetics* 156(2):809-821; Kitamura e Rajewsky (1992); Kitamura e Rajewsky, (1992) *Nature* 356, 154-156).

As células produtoras de anticorpos podem ser derivadas a partir de animais transgênicos e utilizadas, por exemplo, na preparação de hibridomas para a produção de anticorpos VHH de cadeia única como aqui definido. Adicionalmente ou alternativamente, podem ser isoladas sequências de ácidos nucleicos a partir de mamíferos transgênicos e utilizadas para produzir anticorpos de cadeia única, utilizando técnicas de ADN recombinante que são familiares para os especialistas na técnica. Alternativamente ou adicionalmente, podem ser criados anticorpos específicos de cadeia única através da imunização de um animal transgênico como aqui descrito.

Assim, é aqui descrito um método para a produção de anticorpos de cadeia única através da imunização de um mamífero transgênico com um antigénio como aqui descrito.

De um modo preferido, o mamífero é um murganho.

O termo, "imunizar" um mamífero, significa administrar a um mamífero transgênico um antigénio tal que uma resposta imunológica é eleita contra o antigénio. Serão familiares para os especialistas na técnica métodos apropriados para a imunização de mamíferos e são aqui descritos. Os antigénios

apropriados podem ocorrer naturalmente ou sinteticamente. Os antigénios que ocorrem naturalmente incluem proteínas que podem ser, por exemplo, enzimas ou cofactores, péptidos e moléculas de ácidos nucleicos. Um especialista na técnica apreciará que esta lista não pretende ser exaustiva.

Breve Descrição das figuras

A **Figura 1** apresenta um locus do anticorpo de cadeia única preferido.

Definições

“Um gene” compreende um ou mais exões que codificam para um ARNm completo. Um “gene do anticorpo” compreende os exões V, D, J que se recombinam para formar uma região codificante VDJ e que posteriormente, se recombina com uma região constante da cadeia pesada compreendendo um ou mais exões constantes da cadeia pesada. Existem muitos sub-grupos dos exões V, D, J e C. Uma região V particular possui um exão, uma região D possui um exão, uma região J possui um exão e uma região C possui vários exões. Em conjunto, estes formam um gene completo após recombinação quando foi seleccionado um exão V, um exão D, um exão J e uma região C.

“Exão” e “Intrão”. Um **Exão** é uma sequência codificante ou mensageira de desoxinucleótidos. Isto é, é qualquer sequência de ADN em eucariotas que será expressa no final em moléculas de ARNm ou ARNr. Os exões estão habitualmente interpolados com

intrões. Isto é, estes são sequências de ADN que não são expressas no final numa molécula de ARN madura.

Os intrões são excisados do ARN transcrito de novo, de modo a gerar a ARN madura.

Um **"locus VHH da cadeia pesada"** no contexto da presente invenção é compreendido de uma "região VHH", uma "região/exão J", uma "região/exão D" e uma "região constante da cadeia pesada". Cada região VHH compreende um exão VHH, cada região J um exão J, cada região D um exão D e cada região constante da cadeia pesada compreende um ou mais exões da região constante da cadeia pesada.

Um **"exão VHH"** no contexto da presente invenção descreve uma sequência que codifica VHH ocorrendo naturalmente, tal como aquelas encontradas nos Camelídeos e qualquer homóloga, derivada ou seu fragmento desde que o exão resultante possa, quando um constituinte de uma região VHH como aqui definido, recombinar com, pelo menos, uma região D, pelo menos, uma região J e, pelo menos, uma região constante da cadeia pesada, para criar um anticorpo VHH de cadeia única como aqui definido, quando o ácido nucleico é expresso.

Um **"locus VH da cadeia pesada de camelídeo"** no contexto da presente invenção é compreendido de uma ou mais "região/ões VH de camelídeo" como aqui definido, uma ou mais "região/ões J", uma ou mais "região/ões D" e uma "região constante da cadeia pesada". Cada região VH de camelídeo compreende um exão VH de camelídeo, cada região J um exão J e cada região D um exão D e cada região constante da cadeia pesada compreende um ou mais genes da região constante da cadeia pesada.

Um **"exão VH de camelídeo"** no contexto da presente invenção descreve uma sequência que codifica VH ocorrendo naturalmente derivada de mamíferos que não Camelídeos, por exemplo, que foi mutada de modo a que tal sequência é a mesma do que aquela do exão do Camelídeo. Um exão VH de camelídeo também inclui dentro do seu âmbito qualquer homólogo, derivado ou fragmento do exão desde que o exão resultante possa, quando um constituinte de uma região VH de camelídeo, como aqui definido, recombinar com, pelo menos, uma região D, uma região J e uma região constante da cadeia pesada para criar um anticorpo VH de cadeia única de camelídeo como aqui definido.

Um **"exão da região constante da cadeia pesada"** ("exão C_H ") como aqui definido inclui as sequências de exões C_H que ocorrem naturalmente, tais como aqueles encontrados nos camelídeos ou humanos ou outros mamíferos incluindo coelhos e murganhos. O termo "exão C_H " também inclui dentro do seu âmbito derivados, homólogos e seus fragmentos até ao ponto o exão C_H ser capaz de formar um anticorpo de cadeia pesada única funcional como aqui definido quando é um componente de uma região constante da cadeia pesada. De um modo geral, os exões C_H são de quatro tipos diferentes (C_{H1} - C_{H4}) que codificam porções diferentes (domínios) de cada polipéptido constante da cadeia pesada. Contudo, os anticorpos VHH e VH de cadeia única de camelídeo não possuem um domínio $CH1$ funcional (contendo a região de ancoragem do domínio da cadeia leve) nem possuindo um domínio $Ch4$ funcional. Existem um número de sub-grupos de exões da região constante da cadeia pesada. Classes de anticorpos diferentes possuem exões CH diferentes, por exemplo, as moléculas IgM possuem uma ou mais exões da região constante C_μ e as moléculas IgG possuem um ou mais exões C_γ .

O termo, um **"anticorpo VHH de cadeia pesada única"**, no contexto da presente invenção, significa uma molécula de anticorpo que é composta apenas de cadeias pesadas (geralmente duas) e não compreende quaisquer cadeias leves. Cada cadeia pesada compreende uma região variável (codificada pelos exões VHH, D e J) e uma região constante. A região constante compreende ainda uma quantidade de domínios CH codificados por exões da região constante pesada, compreendendo de um modo geral dois: um domínio CH2 e um domínio CH3. Um anticorpo VHH de cadeia única, como aqui definido, não possui um domínio CH1 funcional nem um domínio CH4 funcional. É a falta de um domínio CH1 funcional (que em anticorpos convencionais possui o local de ancoragem para o domínio constante da cadeia leve) que contribui para a incapacidade dos anticorpos de cadeia pesada se associarem com cadeias leves para formar anticorpos convencionais. A sub-classe de anticorpos conhecidos como scIgG2 e/ou scIgG3 compreendem apenas os genes C γ 2 e/ou C γ 3.

O termo **"um anticorpo VH de cadeia pesada única"**, no contexto da presente invenção, significa uma molécula de anticorpo que é composta apenas de cadeias pesadas (geralmente duas) e não compreende quaisquer cadeias leves. Cada cadeia pesada compreende uma região variável (codificada por um "exão VH de camelídeo", exão/ões D e J) e uma região constante. A região constante codificada por exões da região constante codifica ainda uma quantidade de domínios CH, de um modo geral esta compreende dois: um domínio CH2 e um domínio CH3. Um anticorpo VH de cadeia única de camelídeo, como aqui definido, não possui um domínio CH1 funcional ou um domínio CH4 funcional. É a falta de um domínio CH1 funcional (que nos anticorpos convencionais possui o local de ancoragem para o domínio

constante da cadeia leve) que contribui para a incapacidade dos anticorpos de cadeia pesada se associarem com cadeias leves para formar anticorpos convencionais.

"Anticorpos" como aqui utilizados, referem-se a anticorpos ou fragmentos de anticorpos capazes de se ligarem a um alvo seleccionado, e inclui anticorpos monoclonais e policlonais, anticorpos modificados incluindo anticorpos quiméricos, transplantados de CDR e humanizados, e anticorpos seleccionados artificialmente preparados utilizando apresentação de fagos ou técnicas alternativas. Pequenos fragmentos de anticorpo possuem propriedades vantajosas para aplicações em diagnóstico e terapêuticas tendo em conta o seu pequeno tamanho e consequente distribuição nos tecidos superiores.

"Evolução do anticorpo", descreve o processo de mudança de classe e maturação por afinidade (hipermutação somática) que ocorre durante o desenvolvimento do anticorpo e que resulta na formação de anticorpos que se ligam selectivamente e com elevada afinidade.

Descrição detalhada da invenção

Técnicas Gerais

A não ser que definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem o mesmo significado como é entendido habitualmente por um especialista na técnica (e. g., em cultura de células, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridação e bioquímica). As técnicas de referência são utilizadas para

métodos moleculares, genéticos e bioquímicos (ver de um modo geral, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. e Ausebel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc.) e métodos químicos. Adicionalmente, é referido Harlow & Lane., *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., para Técnicas Imunológicas de referência.

Loci VH/h da cadeia pesada da presente invenção

Num primeiro aspecto, a presente invenção proporciona um método para a produção de um anticorpo VHH de cadeia pesada única num mamífero compreendendo o passo da expressão de um locus VHH da cadeia pesada heterólogo nesse mamífero.

Num aspecto posterior, a presente invenção proporciona um método para a produção de um anticorpo VH de cadeia pesada única de camélideo num mamífero compreendendo o passo de expressar um locus VH da cadeia pesada de camélideo nesse mamífero.

A construção de vários loci VHH da cadeia pesada é como descrita no sumário da invenção.

De um modo vantajoso, um locus compreende um ou mais sítios FRT (alvo de recombinação flp) e dois ou mais sítios LoxP (que consiste de duas repetições invertidas de trinta pb separadas por uma região de espaçador assimétrico de 8 pb (Brian Sauer, *Methods of Enzymology*; 1993, Vol 225, 890-900).

De um modo preferido, existem pelo menos dois sítios loxP num locus. A presença dos sítios FRT no locus permite a produção de transgênicos de cópia única, enquanto que a presença de sítios Lox permite, se necessário, a eliminação de genes da cadeia pesada de IgM e IgD.

(A) Vectores

A presente invenção também proporciona vectores incluindo uma construção da presente invenção. De um modo essencial são proporcionados dois tipos de vectores, vectores de replicação e vectores de transformação.

(I) Vectores de Replicação

As construções podem ser incorporadas num vector replicável recombinante, tal como um vector BAC. O vector pode ser utilizado para replicar a construção numa célula hospedeira compatível. Assim, é aqui descrito um método de preparar construções introduzindo uma construção num vector replicável, introduzindo o vector numa célula hospedeira compatível, e crescendo a célula hospedeira sob condições que provocam a replicação da construção. A construção pode ser recuperada a partir da célula hospedeira. As células hospedeiras apropriadas incluem bactérias tais como *E. coli*, leveduras, linhas celulares de mamíferos e outras linhas celulares eucariotas, por exemplo, células Sf9 (baculovírus).

(II) Vectores de transformação

As construções podem também ser incorporadas num vector capaz de inserir a construção num genoma receptor e alcançando assim a transformação. Adicionalmente à construção de tais vectores de transformação podem incluir um ou mais dos seguintes componentes.

Promotores

O promotor é seleccionado habitualmente a partir de promotores que são funcionais em células de mamíferos, porém podem ser utilizados promotores de procariotas e promotores funcionais em outras células eucariotas. O promotor é tipicamente derivado de sequências de promotor de genes virais ou eucariotas. Por exemplo, pode ser um promotor derivado a partir do genoma de uma célula na qual a expressão vai ocorrer. No que diz respeito a promotores eucariotas, estes podem ser promotores que funcionam dum modo ubíquo (tais como promotores da alfa-actina, beta-actina, tubulina) ou, alternativamente, um modo específico de tecido (tais como promotores de genes da imunoglobulina). Estes podem ser também promotores que respondem a estímulos específicos, por exemplo, promotores que ligam receptores da hormona esteróide. Também podem ser utilizados promotores virais, por exemplo o promotor do terminal de repetição longo (MMLV LTR) do vírus da leucemia de murino Moloney, o promotor do vírus do sarcoma Rous (R.SV) LTR ou o promotor do citomegalovírus humano (CMV)IE. Pode ser também vantajoso para os promotores serem indutíveis de modo a que os níveis de expressão do gene heterólogo possam ser regulados durante o tempo de vida da célula. Indutível significa que os

níveis de expressão obtidos utilizando o promotor podem ser regulados.

Adicionalmente, quaisquer destes promotores podem ser modificados pela adição de sequências regulatórias adicionais, por exemplo, sequências intensificadoras. São preferidos os intensificadores capazes de regular a expressão em células produtoras de anticorpos. Em particular, pode ser incluído o intensificador da cadeia pesada necessário para a activação bem sucedida do locus do gene do anticorpo *in vivo* (Serwe, M., e Sablitzky, F., *EMBO J.* 12, p2321-2321, 1993). Podem também ser utilizadas as regiões de controlo do locus (LCRs), em particular a imunoglobulina LCR. Podem também ser utilizados promotores quiméricos compreendendo elementos da sequência a partir de dois ou mais promotores diferentes.

Outros Componentes do Vector

Adicionalmente a um promotor e à construção, os vectores da presente invenção contêm, de um modo preferido, outros elementos úteis para o funcionamento óptimo do vector no mamífero dentro do qual o vector é inserido. Estes elementos são bem conhecidos dos especialistas na técnica, e são descritos, por exemplo em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

Construção de Vectores

Os vectores utilizados para transformar embriões de mamíferos são construídos utilizando métodos bem conhecidos na

técnica, incluindo, sem limitação, as técnicas de referência da digestão por restrição com endonuclease, ligação, purificação de ADN e ARN, sequenciação de ADN como descrito, por exemplo, em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1989]). Em geral, a construção de vector incluirá os seguintes passos:

a) O locus endógeno de murganho é inactivado, por exemplo, utilizando um dos procedimentos de desactivação (e. g. Kitamura, D e Rajewski K., *Nature* 352, p154-156, 1992).

b) As regiões DJ e IgM de uma cadeia pesada apropriada como aqui descrito estão localizadas como um ADN recombinante de uma biblioteca de PAC, BAC ou YAC humana e clonada como um fragmento originado por enzima de restrição, por exemplo um fragmento *Sall*. Esta região também contém o intensificador da cadeia pesada necessário para a activação bem sucedida do locus do gene do anticorpo *in vivo* (ver Serwe, M., Sablitzky, F., *EMBO J.* 12, p2321-2321, 1993).

c) São clonados em primeiro lugar, uma quantidade de "exões VH de camélideo" ou VHH como cosmídeos através da construção de uma biblioteca genómica apropriada por técnicas convencionais. Uma vez que os exões VHH estão localizados entre exões VH, como aqui descrito, estes são clonados, subsequentemente, junto dos exões VHH. Assim, é construída uma sequência de exões VH e VHH. Esta sequência de genes pode ser isolada como um fragmento *MluI* (ou outro enzima de restrição).

d) A LCR da cadeia pesada 3' da imunoglobulina, uma região reguladora necessária para a expressão do locus, é clonada como um fragmento de restrição *SceI*.

e) Os exões da cadeia pesada da região constante são clonados como um fragmento de restrição separado. Os domínios C_H1 e/ou C_H4 codificados pelos seus respectivos exões são tornados não funcionais por recombinação homóloga em bactérias (Imam *et al.*, *Nucleic Acid Research*, 15:E65, 2000) removendo as sequências de excisão do receptor do exão C_H1 e/ou C_H4 (Nguyen *et al.*, *Mol. Immunol.* 36, 514-524, 1999).

Os passos b-e proporcionam as peças para um "locus da cadeia pesada VHH" ou "um locus VH da cadeia pesada de camelídeo" (Fig. 3) que deve tomar controlo da função do locus inactivado do murganho descrito sob a). Estes locus são construídos clonando cada um dos fragmentos pela ordem apropriada num vector apropriado, por exemplo um vector BAC contendo uma região do ligante com todos os sítios de restrição acima descritos (Fig. 1). Os loci criados de acordo com o método são, geralmente, da ordem de 200-250 kB em tamanho. Estes podem ser isolados e purificados à parte do vector por técnicas de laboratório de referência que serão familiares dos especialistas na técnica. O ácido nucleico purificado que codifica o "locus VHH da cadeia pesada" ou "um locus VH da cadeia pesada de camelídeo" (Fig. 1) pode ser subsequentemente introduzido em ovos de murganho fertilizados derivados de murganhos *knockout* descritos em a) através de técnicas de referência para obter murganhos transgênicos que expressam um ou mais loci.

Anticorpos de cadeia única de acordo com a presente invenção

Será entendido que o termo "um anticorpo de cadeia pesada única" e "loci VHH da cadeia pesada" também inclui polipéptidos homólogos e sequências de ácidos nucleicos obtidas a partir de qualquer fonte, por exemplo homólogos celulares relacionados, homólogos de outras espécies e variantes ou seus derivados.

Assim, existem também variantes descritas, homólogos ou derivados dos anticorpos de cadeia pesada única e loci VHH da cadeia pesada como aqui descrito.

No contexto da presente invenção, uma sequência homóloga é levada a incluir uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9% idêntica, de um modo preferido, pelo menos, 98 a 99% idêntica a nível de aminoácidos ao longo de, pelo menos, 30, de um modo preferido, 50, 70, 90 ou 100 aminoácidos. Embora a homologia possa ser também considerada em termos de semelhança (*i. e.* resíduos de aminoácidos possuindo propriedades/funções químicas semelhantes), no contexto da presente invenção é preferido expressar homologia em termos de identidade da sequência.

As comparações por homologia podem ser conduzidas através de olho, ou mais habitualmente, com a ajuda de programas de comparação de sequências facilmente disponíveis. Estes programas informáticos disponíveis comercialmente podem calcular a % de homologia entre duas ou mais sequências.

A % de homologia pode ser calculada ao longo de sequências contíguas, *i. e.* uma sequência é alinhada com a outra sequência

e cada aminoácido numa sequência comparado directamente com o aminoácido correspondente na outra sequência, um resíduo de cada vez. Isto é habitualmente denominado de um alinhamento "sem intervalos", tais alinhamentos sem intervalos são realizados apenas ao longo de uma quantidade relativamente pequena de resíduos (por exemplo menos de 50 aminoácidos contíguos).

Apesar de este ser um método muito única e consistente, este falha tendo em conta que, por exemplo, num par diferente de sequencias idênticas, uma inserção ou eliminação causará que os seguintes aminoácidos sejam colocados fora do alinhamento, resultando, assim, potencialmente numa larga redução na % de homologia quando é realizado um alinhamento global. Consequentemente, a maioria dos métodos de comparação são concebidos para produzir alinhamentos óptimos que tomam em consideração inserções e eliminações possíveis sem penalizar a pontuação da homologia global. Isto é alcançado inserindo "intervalos" no alinhamento da sequência para tentar maximizar a homologia local.

Contudo, estes métodos mais complexos atribuem "penalizações de intervalo" para cada intervalo que ocorre no alinhamento de modo que, para a mesma quantidade de aminoácidos idênticos, um alinhamento da sequência com menos intervalos quanto possível - reflectindo relação mais elevada entre as duas sequencias comparadas - alcançará uma pontuação mais elevada do que uma com muitos intervalos. Os "custos dos intervalos afins" são utilizados habitualmente para cobrar um custo relativamente elevado para a existência de um intervalo e uma penalização mais reduzida para cada resíduo subsequente no intervalo. Este é o sistema de pontuação de intervalos mais habitualmente utilizado. As penalizações de intervalos elevados produzirão certamente

alinhamentos otimizados com menos intervalos. A maioria dos programas de alinhamento permite que sejam modificadas as penalizações do intervalo. Contudo, é preferido utilizar os valores por defeito quando se utiliza tal programa informático para as comparações das sequências. Por exemplo, ao utilizar o GCG Wisconsin Bestfit *package* (ver a seguir) a penalização do intervalo por defeito para as sequências de aminoácidos é 1-12 para um intervalo e -4 para cada extensão.

O cálculo da % máxima de homologia requer em primeiro lugar a produção de um alinhamento óptimo, tomando em consideração as penalizações dos intervalos. Um programa de computador apropriado para realizar tal alinhamento é o GCG Wisconsin Bestfit *package* (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereaux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Exemplos de outros programas informáticos que podem realizar comparações de sequências incluem, mas não estão limitados ao, BLAST *package* (ver Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* - Capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) e o GENWORKS servem de ferramentas de comparação. Ambos BLAST e FASTA estão disponíveis para pesquisa fora de linha e em linha (ver Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, páginas 7-58 a 7-60). Contudo é preferido utilizar o programa GCG Bestfit.

Embora a % de homologia final possa ser medida em termos de identidade, o próprio processo de alinhamento não está habitualmente baseado numa comparação de emparelhamento tudo-ou-nada. Pelo contrário, é habitualmente utilizada uma matriz de pontuação de semelhança com escala que atribui pontuações a cada comparação par-a-par baseada na semelhança química ou distância evolutiva. Um exemplo habitualmente utilizado de tal matriz é a matriz BLOSUM62 - a matriz por defeito para o BLAST

serve para os programas. Os programas GCG Wisconsin utilizam, geralmente, quer os valores por defeito públicos ou uma tabela de comparação de símbolos personalizada se fornecida (ver manual do utilizador ou detalhes adicionais). É preferido utilizar valores por defeito públicos para o pacote GCG, ou no caso de outro programa informático, a matriz por defeito, tal como BLOSUM62.

Uma vez que o programa informático produziu um alinhamento óptimo, é possível calcular a % de homologia, de um modo preferido, % de identidade da sequência. O programa informático executa isto habitualmente como parte da comparação da sequência e cria um resultado numérico.

Métodos para a produção de anticorpos de cadeia única de acordo com a presente invenção

(A) Animais transgénicos

Os loci e vectores da presente invenção podem ser introduzidos num animal para produzir um animal transgénico.

Inserindo os loci no genoma de um animal receptor pode ser alcançado utilizando qualquer técnica evidente para os especialistas na técnica, por exemplo, microinjecção. A seguir à introdução do ácido nucleico num ovo fertilizado, é alcançada a re-implantação utilizando métodos de referência que serão familiares para os especialistas na técnica. Habitualmente o hospedeiro substituído é anestesiado, e os ovos são inseridos no oviducto. A quantidade de ovos implantados num hospedeiro

particular variará, mas será comparável habitualmente com a quantidade de descendência que a espécie habitualmente origina.

Alternativamente, o ADN pode ser introduzido em células estaminais embrionárias (ES) que podem ser inseridas num embrião hospedeiro para derivar murganhos transgênicos através de tecnologia de referência.

Numa forma de realização posterior, o ADN pode ser introduzido em qualquer célula. Os núcleos dessas células são utilizados para substituir os núcleos de um ovo fertilizado que pode ser de qualquer espécie para dar origem a animais transgênicos. Esta técnica de transferência nuclear é familiar para os especialistas na técnica.

A descendência transgênica do hospedeiro substituído pode ser sujeita a rastreio quanto à presença do transgene através de qualquer método apropriado. O rastreio é frequentemente alcançado por análise de Southern ou Northern, utilizando uma sonda que é complementar a, pelo menos, uma porção do transgene. A análise por transferência de Western, utilizando um ligando específico para o anticorpo codificado pelo transgene, pode ser utilizada como um método de rastreio alternativo ou adicional. Habitualmente, são testados os tecidos ou células que se crêem expressar o transgene aos mais elevados níveis, embora quaisquer tipos de tecidos ou células possam ser utilizados para esta análise.

A progenia de mamíferos transgênicos pode ser obtida acasalando o mamífero transgênico com um parceiro apropriado, ou através de fertilização *in vitro* dos ovos e/ou espermatozoides obtido a partir do mamífero transgênico. Quando é utilizada a

fertilização *in vitro*, o embrião fertilizado pode ser implantado num hospedeiro substituído ou incubado *in vitro*, ou ambos. Quando o acasalamento é utilizado para originar progenia transgénica, o mamífero transgénico pode ser acasalado para uma linha parental. Utilizando qualquer um dos métodos, pode ser avaliada a progenia quanto à presença do transgene utilizando métodos anteriormente descritos, ou outros métodos apropriados.

O animal pode ser variadamente fornecido, sendo um mamífero não humano, tal como um roedor e, de um modo preferido, um rato ou murganho. A este nível, é também preferido que o animal receptor seja incapaz de produzir anticorpos que incluam cadeias leves ou que muito menos possuam capacidade reduzida para produzir tais anticorpos. Para alcançar este fim o animal receptor pode ser um animal "knockout" que é capaz de possuir um ou mais genes necessários para a produção de anticorpos com cadeias leves inactivadas ou suprimidas.

Utilizando animais receptores incapazes de produzir anticorpos que incluam cadeias leves ou muito menos com apenas uma capacidade reduzida para produzir tais anticorpos, o método da presente invenção aumenta a produção eficaz de grandes quantidades de anticorpos de cadeia única e células produtores de anticorpos a partir de um animal transgénico após confronto com um dado antigénio.

(B) Tecnologia de exibição de fagos

Os vectores para apresentação de fagos fundem o polipéptido codificado para, e. g., a proteína do gene III (pIII) ou proteína do gene VIII (pVIII) para apresentação na superfície do

fago filamentosos, tal como M13. Ver Barbas et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (ISBN 0-87969-546-3); Kay et al. (eds.) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, San Diego: Academic Press, Inc., 1996; Abelson et al. (eds.), *Combinatorial Chemistry, Methods in Enzymology* vol. 267, Academic Press (May 1996).

Os hospedeiros procariotas são particularmente úteis para a produção de anticorpos apresentando fagos. A tecnologia de anticorpos apresentando fagos, na qual os fragmentos da região variável do anticorpo são fundidos, por exemplo, à proteína do gene III (pIII) ou proteína do gene VIII (pVIII) para apresentar na superfície do fago filamentosos, tal como M13, está neste momento bem demonstrada, Sidhu, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11(6):610-6(2000); Griffiths et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(1):102-8(1998); Hoogenboom et al., *Immunotechnology*, 4(1):1-20 (1998); Rader et al., *Current Opinion in Biotechnology* 8:503-508(1997); Aujame et al., *Human Antibodies* 8:155-168 (1997); Hoogenboom, *Trends in Biotechnol.* 15:62-70 (1997); de Kruif et al., 17:453-455(1996); Barbas et al., *Trends in Biotechnol.* 14:230-234(1996); Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.* 433-455 (1994), e técnicas e protocolos necessários para criar, propagar, sujeitar a rastreio(biosselecção), e utilizar fragmentos de anticorpo a partir de tais bibliotecas foram recentemente compilados, Barbas et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (ISBN 0-87969-546-3); Kay et al. (eds.) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, San Diego: Academic Press, Inc., 1996; Abelson et al. (eds.), *Combinatorial Chemistry, Methods in Enzymology* vol. 267, Academic Press (May 1996).

Como aqui descrito, para a apresentação de fagos de anticorpos incluindo seus fragmentos, de um modo vantajoso, estes são fundidos com a proteína g3p de fago.

(C) Hibridomas

Pode ser utilizado ADN recombinante para preparar anticorpos de cadeia única utilizando um determinado procedimento, em cultura de células bacterianas ou, de um modo preferido, de mamíferos. O sistema de cultura de células seleccionado secreta, de um modo preferido, o produto do anticorpo de cadeia única.

A multiplicação das células do hibridoma ou células hospedeiras de mamífero *in vitro* é realizada em meios de cultura apropriados, que são meios de cultura de referência habituais, por exemplo, Meio de Dulbecco com modificação de Eagle (DMEM) ou meio RPM 1640, completado opcionalmente através de um soro de mamífero, e. g., soro fetal de vitela, ou elementos vestigiais e suplementos de manutenção do crescimento, e. g. células alimentadoras, tais como células exsudadas peritoneais de murganho normal, células do baço, macrófagos da medula espinal, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baixa densidade, ácido oleico, ou afins. A multiplicação das células hospedeiras que são células bacterianas ou células de levedura é igualmente realizada em meio de cultura apropriado conhecido na técnica, por exemplo, para bactérias em meio LB, NZCYM, NZYM, NZM, Caldo Intenso, SOB, SOC, 2 x YT, ou Meio Mínimo M9, e para leveduras em meio YPD, YEPD, Meio Mínimo, ou Meio Mínimo Limitado Completo.

A produção *in vitro* proporciona preparações de imunoglobulina relativamente puras e permite expandir para fornecer grandes quantidades das imunoglobulinas desejadas. As técnicas para a cultura de células bacterianas, de leveduras ou células de mamíferos são conhecidas na técnica e incluem cultura em suspensão homogênea, e. g. num reactor com arejamento ou num reactor de agitação contínua, ou cultura de células imobilizadas ou aprisionadas, e. g. em fibras côncavas, microcápsulas, em microesferas de agarose ou cartuchos de cerâmica.

Podem ser também obtidas grandes quantidades das imunoglobulinas desejadas através da multiplicação de células de mamífero *in vivo*. Para este propósito, as células do hibridoma produzindo as imunoglobulinas desejadas são injectadas em mamíferos histocompatíveis para provocar crescimento de tumores produtores de anticorpos. Opcionalmente, é fornecido aos animais um hidrato de carbono, especialmente óleos minerais, tais como, pristano (tetrametil-pentadecano), antes da injeção. Após uma a duas semanas, as imunoglobulinas são isoladas a partir dos fluidos corporais desses mamíferos. Por exemplo, as células de hibridomas obtidas através da fusão de células de mieloma apropriadas com células de baço produtoras de anticorpo a partir de murganhos Balb/c, ou são injectadas intraperitonealmente células transfeccionadas derivadas a partir da linha celular de hibridoma Sp2/0 que produz os anticorpos desejados em murganhos Balb/c opcionalmente pré-tratados com pristano, e, após uma a duas semanas, é retirado fluido ascítico dos animais.

As técnicas antecedentes, e outras, são discutidas em, por exemplo, Kohler e Milstein, (1975) *Nature* 256:495-497; documento US 4376110; Harlow e Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*,

(1988) Cold Spring Harbor Techniques para a preparação de moléculas de anticorpos recombinantes é descrita nas referências anteriores e também, por exemplo, no documento EP 0623679; documento EP 0368684 e documento EP 0436579.

Os sobrenadantes da cultura de células são sujeitas a rastreio para os anticorpos desejados, de um modo preferido por coloração com imunofluorescência de células expressando o alvo desejado através de transferência imunológica, através de um ensaio imunológico enzimático, e. g. um ensaio em *sandwich* ou um ensaio por gota, ou um radioensaio.

Para o isolamento dos anticorpos, aqueles presentes nos sobrenadantes da cultura ou no fluído ascítico podem ser concentrados, e. g. através de precipitação com sulfato de amónio, diálise contra material higroscópico, tal como polietilenoglicol, ou filtração através de membranas selectivas. Se necessário e/ou desejado, os anticorpos são purificados por métodos de cromatografia habituais, por exemplo filtração em gel, cromatografia de troca iónica, cromatografia sobre celulose-DEAE e/ou cromatografia de (imuno-)afinidade, e. g. cromatografia de afinidade com a molécula alvo com Proteína A.

(3) Imunização de um animal transgénico

A presente descrição também descreve um método de produção de anticorpos de cadeia única compreendendo administrar um antigénio a um animal transgénico.

Os anticorpos de cadeia única, produzidos a partir de animais transgênicos, incluem anticorpos de cadeia única policlonais e monoclonais e seus fragmentos. Se forem desejados anticorpos policlonais, o animal transgênico (e. g., murganho, coelho, cabra, cavalo, etc.) pode ser imunizado com um antigénio e soro do animal imunizado, recolhido e tratado de acordo com os procedimentos conhecidos. Se o soro contendo anticorpos policlonais contém anticorpos para outros antigénios, os anticorpos policlonais de interesse podem ser purificados através de cromatografia de imunoafinidade e técnicas semelhantes que serão familiares para os especialistas na técnica. As técnicas para preparar e processar anti-soro policlonal são também conhecidas na técnica.

Utilizações de anticorpos de cadeia única de acordo com a presente invenção

Os anticorpos de cadeia única, incluindo os seus fragmentos, podem ser utilizados em terapêuticas *in vivo* e aplicações profiláticas, aplicações em diagnóstico *in vitro* e *in vivo* e ensaio *in vitro* e aplicações como reagente.

As utilizações terapêuticas e profiláticas de anticorpos de cadeia única envolvem a administração dos anteriores a mamíferos receptores, tal como um humano.

Os "anticorpos VH de cadeia pesada única de camelídeo" possuem várias vantagens sobre as moléculas de anticorpo VHH de cadeia única de camelídeo no tratamento de humanos. Por exemplo, os anticorpos VH de cadeia única de camelídeo possuem um sítio de ligação da proteína A no caso dos anticorpos baseados na

família de genes VH3. Adicionalmente, quando administrado a humanos, os anticorpos VH de cadeia única de camelídeo são esperados apresentar imunogenicidade inferior do que os anticorpos VHH de cadeia única de camelídeo.

Será também apreciado que os "anticorpos VH de cadeia pesada única" e "anticorpos VHH de cadeia pesada única de camelídeos" possuem algumas características físicas diferentes que os anticorpos convencionais de cadeia dupla. Por exemplo, devido à carência de um domínio pesado CH1 funcional, os anticorpos da presente invenção não se ligam a molécula complemento C1q que está envolvida na activação da via clássica do complemento.

São preferidos os anticorpos de cadeia única substancialmente puros incluindo seus fragmentos de pelo menos 90 a 95% de homogeneidade para administração num mamífero, e é mais preferido, 98 a 99% ou mais homogeneidade para utilizações farmacêuticas, em especial quando o mamífero é um humano. Uma vez purificado, parcialmente ou para homogeneidade como desejado, os anticorpos de cadeia única como aqui descritos podem ser utilizados para diagnóstico ou terapêutica (incluindo extracorporal) ou no desenvolvimento e realização de processos de ensaio utilizando métodos conhecidos dos especialistas na técnica.

Os anticorpos de cadeia única habitualmente seleccionados encontrarão utilidade na prevenção, supressão ou tratamento de condições inflamatórias, hipersensibilidade alérgica, cancro, infecção bacteriana ou viral, e distúrbios autoimunes (que incluem, mas não estão limitados a, diabetes Tipo I, esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus sistémico eritematoso,

doença de Crohn e miastenia gravis), e na prevenção da rejeição a transplante. Por exemplo, o esgotamento das células T regulatórias ou interferência com a sua selecção pode resultar numa resposta imunológica aumentada que pode ser de utilização particular no tratamento de infecções que escapam igualmente uma resposta imunológica normal.

Adicionalmente, os anticorpos de cadeia única seleccionados incluindo seus fragmentos podem ser úteis para modular uma resposta imunológica em regiões de um vertebrado em que estes não estão normalmente localizados. Por exemplo, um ou mais anticorpos utilizados como aqui descrito podem ser perfundidos, injectados, num tecido de um vertebrado, utilizando técnicas conhecidas dos especialistas na técnica. A presença de um anticorpo como aqui descrito, em tal ambiente ectópico pode ser útil na modulação de uma resposta imunológica durante, por exemplo, rejeição ao transplante e afins.

Na aplicação imediata, o termo "prevenção" envolve administração da composição protectora antes da indução da doença. A "supressão" refere-se à administração da composição após um evento indutivo, mas anteriormente à evidência clínica da doença. O "tratamento" envolve administração da composição protectora após se manifestarem os sintomas da doença.

Estão disponíveis sistemas de modelo animal que podem ser utilizados para efectuar o rastreio da eficácia dos anticorpos seleccionados na protecção contra ou tratamento da doença. São conhecidos na técnica métodos para o teste de lúpus sistémico eritematoso (SLE) em murganhos susceptíveis (Knight *et al.* (1978) *J. Exp. Med.*, **147**:1653; Reinersten *et al.* (1978) *New Eng. J. Med.*, **299**:515). Myasthenia Gravis (MG) é testada em murganhos

fêmeas SJL/J induzindo a doença com proteína AchR solúvel a partir de outras espécies (Lindstrom *et al.* (1988) *Adv. Immunol.*, **42**:233). A artrite é induzida numa estirpe susceptível de murganhos através de injeção de colagénio Tipo II (Stuart *et al.* (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, **42**:233). Foi descrito um modelo através do qual o adjuvante da artrite é induzido em ratos susceptíveis através de injeção de proteína de choque calorífico de micobacteria (Van Eden *et al.* (1988) *Nature*, **331**:171). A tiroidite é induzida em murganhos através de administração de tiroglobulina como descrito (Maron *et al.* (1980) *J. Exp. Med.*, **152**:1115). A diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM) ocorre naturalmente ou pode ser induzida em certas estirpes de murganhos tais como aquelas descritas por Kanasawa *et al.* (1984) *Diabetologia*, **27**:113. A EAE em murganhos e ratos serve como um modelo para MS em humanos. Neste modelo, a doença desmielinizante é induzida através de administração de proteína básica de mielina (ver Peterson (1986) *Textbook of Immunopatology*, Mischer *et al.*, eds., Grune e Stratton, New York, pp. 179-213; Mcfarlin *et al.* (1973) *Science* **179**:478: e Satoh *et al.* (1987) *J. Immunol.*, **138**:179).

Geralmente, os anticorpos de cadeia única seleccionados serão utilizados na forma purificada em conjunto com transportadores farmacologicamente apropriados. Habitualmente, estes transportadores incluem soluções aquosas ou alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo qualquer meio salino e/ou tamponado. Os veículos parentéricos incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio e Ringer lactado. Os adjuvantes fisiologicamente aceitáveis apropriados, se necessário para manter um complexo polipeptídico em suspensão, pode ser escolhida a partir de espessantes tais como

carboximetilcelulose, polivinilpirrolidona, gelatina e alginatos.

Os veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluidos e nutrientes e reabastecedores de electrólitos, tais como aqueles baseados em dextrose de Ringer. Podem também estar presentes conservantes e outros aditivos, tais como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a Edição).

Os anticorpos de cadeia única seleccionados incluindo seus fragmentos podem ser utilizados como composições administradas separadamente ou em conjunto com outros agentes. Estes podem incluir vários fármacos imunoterapêuticos, tais como ciclosporina, metotrexato, adriamicina ou cisplatino, e imunotoxinas. As composições farmacêuticas podem incluir "cocktails" de vários agentes citotóxicos ou outros agentes em conjunto com os anticorpos seleccionados, ou células T ou até combinações dos anticorpos seleccionados.

A via de administração das composições farmacêuticas pode ser qualquer uma daquelas conhecidas habitualmente dos especialistas da técnica. Para terapêutica, incluindo terapia imunológica sem limitação, os anticorpos seleccionados, receptores ou suas proteínas de ligação podem ser administrados qualquer doente de acordo com técnicas de referência. A administração pode ser por qualquer modo apropriado, incluindo, parental, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, transdérmico, através da via pulmonar, ou também, apropriadamente, através de infusão directa com um cateter. A dosagem e frequência de administração dependerão da idade, sexo

e condição do doente, administração simultânea de outros fármacos, contra-indicações e outros parâmetros a serem tomados em conta pelo clínico.

Os anticorpos seleccionados podem ser liofilizados para armazenamento e reconstituídos num veículo apropriado antes da utilização. Podem ser utilizadas as técnicas de liofilização e reconstituição conhecidas. Será apreciado pelos especialistas na técnica que a liofilização e reconstituição pode levar a variados graus de perda de actividade funcional e que os níveis de utilização possam ter de ser ajustados superiormente para compensar.

Adicionalmente, os anticorpos podem ser utilizados para fins de diagnóstico. Por exemplo, os anticorpos aqui descritos podem ser criados ou crescidos contra antigénios que são especificamente expresso durante condições de doença ou cujos níveis se alteram durante um dado estado de doença.

Para certos fins, tais como diagnóstico ou fins de sinalização podem ser adicionados marcadores. Os marcadores apropriados incluem mas não estão limitados a quaisquer dos seguintes, marcações radioactivas, marcações por NMR *spin* e marcações fluorescentes. Os meios para a detecção das marcações serão familiares para os especialistas na técnica.

Exemplos de marcações radioactivas apropriadas incluem technetium-99m (^{99m}Tc) ou iodina-123 (^{123}I). As marcações tais como iodina-123, iodina-131, indium-111, fluorina-19, carbono-13, nitrogénio-15, oxigénio-17, gadolínio, manganésio ou ferro permitem a detecção da marcação utilizando NMR. As marcações tais como metionina ^{11}C e FDG são apropriados para utilizar na

técnica da tomografia de emissão de positrão. As descrições dos processos e protocolos para utilizar PET são familiares para os especialistas na técnica.

Um fluoróforo apropriado é GFP ou um seu mutante. O GFP e os seus mutantes podem ser sintetizados em conjunto com os anticorpos ou molécula alvo através da expressão com esta como um polipéptido de fusão, de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, pode ser construída uma unidade de transcrição como uma fusão em grelha do GFP desejado e a imunoglobulina ou alvo, e inserida num vector como descrito anteriormente, utilizando clonagem por PCR convencional e técnicas de ligação.

Anticorpos como aqui descritos podem ser marcados com qualquer agente capaz de gerar um sinal. O sinal pode ser qualquer sinal detectável, tal como a indução da expressão de um produto do gene detectável. Exemplos de produtos do gene detectável incluem polipéptidos bioluminescentes, tais como luciferase e GFP, polipéptidos detectáveis através de ensaios específicos, tais como beta-galactosidase e CAT, e polipéptidos que modulam as características de crescimento da célula hospedeiro, tais como enzimas necessárias para metabolismo, tal como HIS3, ou genes de resistência ao antibiótico, tal como G418.

As composições contendo os antibióticos seleccionados ou um seu *cocktail* podem ser administradas para tratamentos profilácticos e/ou terapêuticos. Em certas aplicações terapêuticas, uma quantidade adequada para alcançar pelo menos inibição parcial, supressão, modulação, morte, ou alguns outros parâmetros mensuráveis, de uma população das células

seleccionadas é definido como uma "dose eficaz terapêuticamente". Quantidades necessárias para alcançar esta dosagem dependerá da severidade da doença e da condição geral do sistema imunitário do doente, mas geralmente varia desde 0,00005 a 5,0 mg do anticorpo de cadeia única seleccionado por kilograma de peso corporal, com doses de 0,0005 mg a 2,0 mg/kg/dose sendo mais habitualmente utilizadas. Para aplicações profilácticas, composições contendo os presentes polipéptidos seleccionados ou seus cocktails podem também ser administrados em dosagens semelhantes ou ligeiramente inferiores.

Uma composição contendo um ou mais anticorpos seleccionados pode ser utilizada em composições profilácticas e terapêuticas para ajudar na alteração, inactivação, morte ou remoção num mamífero de uma população de células alvo seleccionada. Adicionalmente, os reportórios seleccionados dos polipéptidos aqui descritos podem ser selectivamente utilizados extracorporalmente ou *in vitro* para matar, esgotar, ou igualmente remover eficazmente uma população de células alvo de uma colecção de células heterogéneas. O sangue de um mamífero pode ser combinado extracorporalmente com os anticorpos seleccionados, receptores à superfície da célula ou suas proteínas de ligação através das quais as células não desejadas são mortas ou igualmente removidas do sangue para voltar ao mamífero de acordo com as técnicas de referência.

Lisboa, 15 de Maio de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um anticorpo VHH de cadeia pesada única num mamífero transgênico não humano compreendendo o passo da expressão um locus VHH da cadeia pesada nesse mamífero, em que o locus VHH da cadeia pesada é compreendido por uma região VHH, uma região J, uma região D e uma região constante da cadeia pesada em que, quando expressa, a região constante da cadeia pesada não expressa um domínio CH1 funcional nem um domínio CH4 funcional.
2. Método da reivindicação 1, em que o locus VHH da cadeia pesada compreende, pelo menos, uma região D de origem humana e, pelo menos, uma região J de origem humana.
3. Método para a produção de um anticorpo VH de cadeia pesada simples de camélídeo num mamífero transgênico não humano compreendendo o passo da expressão de um locus VH da cadeia pesada de camélídeo nesse mamífero, em que o locus VH da cadeia pesada de camélídeo é compreendido por uma região VH de camélídeo, uma região J, uma região D e uma região constante da cadeia pesada, em que, quando expressa, a região constante da cadeia pesada não expressa um domínio CH1 funcional nem um domínio CH4 funcional.
4. Método da reivindicação 3, em que o locus VH da cadeia pesada de camélídeo compreende, pelo menos, uma região D de origem humana e, pelo menos, uma região J de origem humana.
5. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a região constante da cadeia pesada compreende um ou mais

exões constantes da cadeia pesada seleccionada do grupo consistindo de C_{δ} , $C_{\gamma 1-4}$, C_{ϵ} e $C_{\alpha 1-2}$.

6. Método da reivindicação 5, em que apenas um ou mais genes $C_{\gamma 2}$ e/ou $C_{\gamma 3}$ com domínios não funcionais CH1 estão presentes na região constante da cadeia pesada.
7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a região constante da cadeia pesada compreende, pelo menos, um gene constante da cadeia pesada que é proveniente de camelídeo.
8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a região constante da cadeia pesada compreende, pelo menos, um gene constante da cadeia pesada que não é de origem de camelídeo.
9. Método da reivindicação 8, em que a região constante da cadeia pesada compreende, pelo menos, um gene constante da cadeia pesada que é de origem humana.
10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o locus VHH ou VH da cadeia pesada de camelídeo compreende ainda uma sequência de recombinação (rss) capaz de recombinar uma região J directamente com um gene constante da cadeia pesada.
11. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o locus VHH ou VH de camelídeo expressa um anticorpo híbrido de cadeia pesada única.

12. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que os loci da cadeia pesada endógenos para os mamíferos são eliminados ou silenciados.
13. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo ainda a imunização de mamíferos transgênicos não humanos com um antigénio de modo que a resposta imunológica seja aumentada contra o antigénio, resultando na formação de um anticorpo monoclonal ou policlonal específico de cadeia pesada única maturado por afinidade.
14. Método de acordo com a reivindicação 13, compreendendo ainda a preparação de hibridomas e a produção e rastreio de células produtoras de anticorpo específico de cadeia pesada única.
15. Método da reivindicação 13, compreendendo ainda o isolamento de sequências de ácido nucleico de animais transgênicos imunizados para a produção de anticorpos específicos de cadeia pesada única, ou seus fragmentos, utilizando técnicas de ADN recombinante.
16. Método da reivindicação 15, compreendendo ainda a utilização de técnicas e protocolos de fagos para criar, propagar e sujeitar a rastreio anticorpos específicos de cadeia pesada única, ou seus fragmentos.
17. Método de acordo com a reivindicação 15, compreendendo ainda a produção de grandes quantidades de anticorpos específicos de cadeia pesada única, ou seus fragmentos, utilizando cultura de células bacterianas, de leveduras ou de mamíferos.

18. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o mamífero transgénico não humano é um murganho.
19. Vector compreendendo um locus VHH da cadeia pesada ou um locus VHH da cadeia pesada de camelídeo, como definido em qualquer das reivindicações 1 a 11.
20. Célula hospedeira transformada com um locus VHH de cadeia pesada ou um locus VH de cadeia pesadas de camelídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

Lisboa, 15 de Maio de 2007

■ Loci humano
■ Loci de Lama ou Camelo

Fragmento injectado no IgM de murganho em murganhos

Approx. 220kb

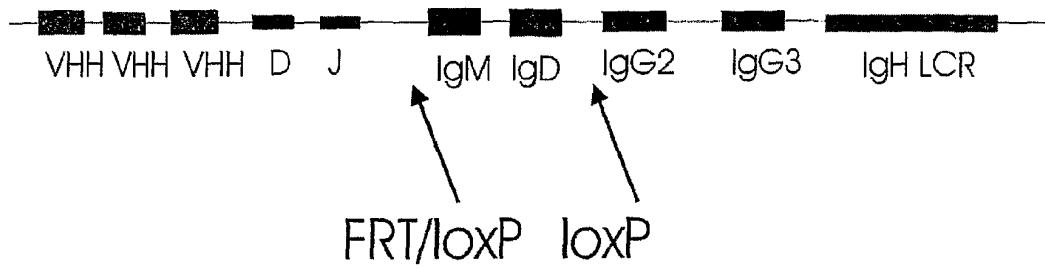


FIGURA 1