



(11) *Número de Publicação:* PT 656946 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N015/13 A C07K016/00 B
C07K016/46 B

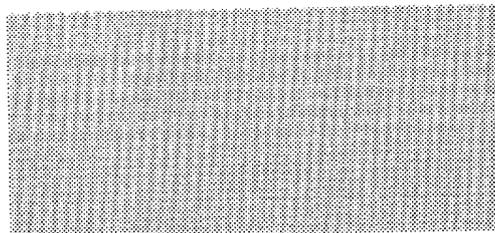
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1993.08.18</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1992.08.21 EP 92402326 1993.05.21 EP 93401310</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.06.14</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.08.01</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL PLEINLAAN 2 B-1050 BRUSSELS BE</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> CÉCILE CASTERMAN RAYMOND HAMERS BE BE</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT</p>
---	--

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

(57) *Resumo:*

IMUNOGLOBULINAS DESPROVIDAS DE CADEIAS LEVES



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt



FOLHA DO RESUMO (Continuação)

PAT. INV. <input type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º _____		N.º Objectos _____ N.º Desenhos _____		DATA DO PEDIDO ____/____/____ (22)	

RESUMO (continuação) (57)

A invenção diz respeito a uma imunoglobulina isolada, caracterizada pelo facto de compreender duas cadeias polipeptídicas pesadas suficientes para a formação de um local completo de ligação do antígeno ou vários locais de ligação dos antígenos, sendo ainda esta imunoglobulina desprovida de cadeias polipeptídicas leves.

NÃO EScrever NAS ZONAS SOMBREADAS



Descrição

258

“Imunoglobulinas desprovidas de cadeias leves”

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

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

Entre as proteínas que formam a classe de imunoglobulinas, a maior parte delas são anticorpos e consequentemente apresentam um local de ligação do antígeno ou vários locais de ligação dos antígenos.

238
2

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

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

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

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

E.S. Ward *et al.* (1) descreveram algumas experiências efectuadas sobre os domínios variáveis das cadeias polipeptídicas pesadas (V_H) ou/e sobre as cadeias polipeptídicas leves

(V_K/F_V), para testar a capacidade destes domínios variáveis para se ligarem a antígenos específicos. Para o efeito, foi preparado um banco de genes V_H a partir de ADN genómico do baço de murganhos previamente imunizados com estes antígenos específicos.

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

A publicação de Blier P.R. *et al.* (The Journal of Immunology, vol. 139, 3996-4006, nº 12, 15 de Dezembro de 1987) descreve a seguinte sequência de aminoácidos:

QVQLQQPGAELGKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGRGREWIGRIDPNS
GGTKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR.

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

Os inventores determinaram que as imunoglobulinas podem ter uma estrutura diferente daquela que está consagrada para o modelo conhecido de quatro cadeias e que essas imunoglobulinas diferentes proporcionam novos meios para a preparação de reagentes de diagnóstico, agentes terapêuticos ou quaisquer outros reagentes utilizáveis para fins de investigação ou industriais.

Assim sendo, a presente invenção proporciona novas imunoglobulinas que são capazes de apresentar propriedades funcionais das imunoglobulinas do modelo de quatro cadeias, embora

258
4

a sua estrutura pareça ser mais apropriada, em muitas circunstâncias, para a sua utilização, para a sua preparação e em alguns casos para a sua modificação. No entanto, estas moléculas podem ser consideradas como estruturas de primeiro plano para a modificação de outras imunoglobulinas. As vantagens proporcionadas por estas imunoglobulinas compreendem a possibilidade de as preparar mais facilmente.

Em consequência, a invenção diz respeito a imunoglobulinas caracterizadas pelo facto de compreenderem duas cadeias polipeptídicas pesadas, suficientes para a formação de um local de ligação do antígeno completo ou de vários locais de ligação dos antígenos, sendo ainda essas imunoglobulinas desprovidas de cadeias polipeptídicas leves. De acordo com um caso particular da invenção, estas imunoglobulinas caracterizam-se ainda pelo facto de serem o produto da expressão, numa célula hospedeira procariótica ou eucariótica, de um ADN ou de um ADNc que possua a sequência de uma imunoglobulina desprovida de cadeias leves, susceptível de se obter a partir de linfócitos ou outras células de Camelídeos.

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

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

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

Estas imunoglobulinas, que podem ser preparadas pela técnica do ADN recombinante ou isoladas a partir de animais, serão designadas por vezes por “imunoglobulinas de cadeias pesadas” nas páginas subsequentes. De acordo com uma variante preferencial da invenção, estas imunoglobulinas encontram-se numa forma pura.

De acordo com uma primeira variante, as imunoglobulinas da presente invenção podem ser obtidas em células procarióticas, especialmente em células de *E. coli*, por um processo que compreende os passos seguintes:

- a) efectuar a clonagem, num vector ‘Bluescript’, de uma sequência de ADN ou de ADNc que codifique o domínio V_{HH} de uma imunoglobulina desprovida de cadeia leves, susceptível de ser obtida, por exemplo, a partir dos linfócitos de Camelídeos,
- b) recuperar o fragmento clonado após a amplificação, utilizando um iniciador de 5’ que contém um local *Xho* e um iniciador de 3’ que contém o local *Spe* que possui a sequência seguinte:
TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG,
- c) clonar o fragmento recuperado em fase no vector ‘immuno PBS’ após a digestão do vector com as enzimas de restrição *Xho* e *Spe*,
- d) transformar células hospedeiras, especialmente de *E. coli*, por transfecção com o vector ‘Immuno PBS’ recombinante do passo c,
- e) recuperar o produto de expressão da sequência de codificação V_{HH} , por exemplo, utilizando anticorpos criados contra o domínio V_{HH} dos dromedários.

258

De acordo com outra variante, as imunoglobulinas são imunoglobulinas heteroespecíficas que podem ser obtidas por um processo que compreende os passos seguintes:

- obter uma primeira sequência de ADN ou de ADNc que codifique um domínio V_{HH} ou uma parte sua, que tenha uma especificidade determinada contra um determinado antígeno e que esteja compreendido entre os locais *Xho* e *Spe*,
- obter uma segunda sequência de ADN ou de ADNc que codifique um domínio V_{HH} ou uma parte sua, que possua uma especificidade determinada, diferente da especificidade da primeira sequência de ADN ou de ADNc, e que esteja compreendido entre os locais *Spe* e *EcoRI*,
- fazer digerir um vector 'immuno PBS' com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*,
- ligar as sequências de ADN ou de ADNc obtidas, que codificam os domínios V_{HH} , de modo a que as sequências de ADN ou de ADNc sejam clonadas sequencialmente no vector,
- transformar uma célula hospedeira, em especial uma célula de *E. coli*, por transfecção e recuperar as imunoglobulinas obtidas.

De acordo com outra variante, as imunoglobulinas podem ser obtidas por um processo que compreende os passos seguintes:

- obter uma sequência de ADN ou de ADNc que codifique um domínio V_{HH} ou uma parte sua, que tenha um local de ligação do antígeno com uma especificidade determinada,
- amplificar o ADN ou o ADNc obtido, utilizando um iniciador de 5' que contenha um codão de iniciação e um local *HindIII*, e utilizando um iniciador de 3' que contenha um codão de terminação que possua um local *XhoI*,

258

- efectuar a recombinação do ADN ou do ADNc amplificado no interior dos locais *Hind*III (posição 2650) e *Xho*I (posição 4067) do plasmídeo pMM984,
- efectuar a transfecção de células permissivas, especialmente células NB-E, com o plasmídeo recombinante,
- recuperar os produtos obtidos.

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

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

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

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

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

288

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

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

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

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

O(s) local(is) das imunoglobulinas da presente invenção, de ligação do(s) antígeno(s), estão localizado(s) na região variável da cadeia pesada.

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

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

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

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

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

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

Os termos Fla, F(la)₂, F(la')₂, Flac, Fd e Fv (em inglês respectivamente Fab, F(ab)₂, F(ab')₂, Fabc, Fd e Fv) deixam de ser aplicáveis no seu sentido original, na medida em que tais fragmentos possuem em alternativa uma cadeia leve, a parte variável da cadeia leve ou o domínio C_{H1} .

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

De acordo com outra variante da invenção, as imunoglobulinas que satisfazem às definições anteriormente aqui apresentadas podem ser obtidas a partir de animais, em especial a partir de animais da família dos Camelídeos. Os inventores concluíram que as imunoglobulinas de cadeia pesada que se encontram presentes nos Camelídeos não estão associadas a uma situação patológica que poderia induzir a produção de anticorpos anormais relativamente às

imunoglobulinas de quatro cadeias. Com base num estudo comparativo entre Camelídeos do velho mundo (*Camelus bactrianus* e *Camelus dromedarius*) e Camelídeos do novo mundo (por exemplo, *Lama paccos*, *Lama glama* e *Lama vicugna*), os inventores demonstraram que as imunoglobulinas da invenção, que são desprovidas de cadeias polipeptídicas leves, existem em todas as espécies. Apesar disso, pode haver diferenças no peso molecular destas imunoglobulinas, dependendo disso dos animais. Em especial, o peso molecular de uma cadeia pesada existente nestas imunoglobulinas pode estar compreendido entre cerca de 43 kd e cerca de 47 kd, sendo em particular igual a 45 kd.

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

As imunoglobulinas de acordo com esta variante particular da invenção podem ser obtidas por purificação a partir de soro de Camelídeos, havendo um processo para a sua purificação que está descrito minuciosamente nos exemplos. No caso em que as imunoglobulinas são obtidas a partir de Camelídeos, a invenção refere-se às imunoglobulinas que não estão no seu ambiente biológico natural.

De acordo com a invenção, a imunoglobulina IgG2, quando obtida por purificação a partir do soro de Camelídeos, pode ser caracterizada pelos factos seguintes:

- não é adsorvida por cromatografia na coluna de 'Proteína G-Sepharose',
- é adsorvida por cromatografia numa coluna de 'Proteína A-Sepharose',
- possui um peso molecular de cerca de 100 kd após a eluição com uma solução tampão a pH 4,5 (NaCl 0,15 M com ácido acético a 0,58%, ajustada para o valor de pH igual a 4,5 com NaOH),
- é constituída por cadeias polipeptídicas γ_2 pesadas com um peso molecular de cerca de 46 kd e preferencialmente 45 kd após redução.

De acordo com outra variante da invenção, há um outro grupo de imunoglobulinas, correspondente à IgG3, que podem ser obtidas por purificação a partir do soro de Camelídeos, que se caracterizam pelo facto de uma dessas imunoglobulina ter as particularidades seguintes:

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

Apesar disso, as imunoglobulinas da invenção, que são desprovidas de cadeias leves, possuem nas suas cadeias pesadas uma região constante e uma região variável. A região constante é constituída por diferentes domínios.

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

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

para o domínio da armação estrutural 1

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

para o domínio da armação estrutural 4

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

para o domínio da RDC3

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

Conforme se disse antes, as imunoglobulinas da invenção são preferencialmente desprovidas da totalidade do seu domínio C_{H1} .

Tais imunoglobulinas possuem domínios C_{H2} e C_{H3} na região do terminal C relativa à região de charneira.

De acordo com uma variante particular da invenção, a região constante das imunoglobulinas compreende os domínios C_{H2} e C_{H3} constituídos por uma sequência de aminoácidos seleccionada entre as seguintes:

para o domínio C_{H2} :

APELLGGPTVFIFPPKPKDVLSITLTP
APELPGGPSVVFVPTKPKDVLSISGRP
APELPGGPSVVFVPPKPKDVLSISGRP
APELLGGPSVVFIFPPKPKDVLSISGRP

para o domínio C_{H3} :

GQTREPQVYTLA
GQTREPQVYTLAPXRLEL
GQPREPQVYTLPPSRDEL
GQPREPQVYTLPPSREEM
GQPREPQVYTLPPSQEEM

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

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

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

GTNEVCKCPKCP

ou

EPKIPQPQPKPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP.

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

A V_{HH} isolada, obtida a partir de imunoglobulinas de cadeias pesadas, ou os bancos de V_{HH} correspondentes às imunoglobulinas de cadeias pesadas, podem distinguir-se da clonagem V_{HH} de imunoglobulinas do modelo de quatro cadeias, com base nas particularidades das sequências que caracterizam as imunoglobulinas de cadeias pesadas.

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

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

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

Uma segunda particularidade específica do domínio V_{HH} dos camélídeos é a presença frequente de um resíduo cisteína da RDC_3 associado a um resíduo cisteína na posição 31 ou 33 da RDC ou na posição 45 da região AE_2 (em inglês FW_2). A possibilidade de se estabelecer uma ponte dissulfureto entre a RDC_3 e a parte restante do domínio variável poderia contribuir para a estabilidade e para o posicionamento do local de ligação.

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

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

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

Uma outra propriedade interessante das imunoglobulinas da invenção é o facto de poderem ser modificadas e em especial poderem ser humanizadas. De uma forma peculiar, é possível substituir a totalidade ou uma parte da região constante destas imunoglobulinas pela totalidade ou por uma parte de uma região constante de um anticorpo humano. Por exemplo, os domínios C_{H2} e/ou C_{H3} da imunoglobulina podem ser substituídos pelos domínios C_{H2} e/ou C_{H3} da imunoglobulina IgG humana de cadeia γ_3 .

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

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

A invenção também diz respeito a um fragmento de uma imunoglobulina do tipo aqui anteriormente descrito, e em especial diz respeito a um fragmento seleccionado entre o conjunto seguinte:

- um fragmento correspondente a uma cadeia polipeptídica pesada de uma imunoglobulina desprovida de cadeias leves,
- fragmentos obtidos por digestão enzimática das imunoglobulinas da invenção, em especial aqueles que são obtidos por digestão parcial com papaína, dando origem ao fragmento Fc (fragmento constante) e dando origem ao fragmento FV_{HH}h (que contém locais das cadeias pesadas onde se ligam os antigénios) ou o seu dímero F(V_{HH}h)₂ ou um fragmento obtido por meio de outra digestão do fragmento Fc com papaína, dando origem ao fragmento pFc correspondente à parte do terminal C do fragmento Fc,
- fragmentos homólogos obtidos com outras enzimas proteolíticas,
- um fragmento que possua pelo menos 10 e de preferência 20 aminoácidos da região variável da imunoglobulina, ou a região variável completa, em especial um fragmento correspondente aos domínios V_{HH} isolados ou aos dímeros de V_{HH} ligados à ponte dissulfureto da charneira,

- um fragmento correspondente à região de charneira da imunoglobulina, ou correspondente pelo menos a 6 aminoácidos desta região de charneira,
- um fragmento da região de charneira que possua uma sequência repetida de Pro-X,
- um fragmento corresponde pelo menos a 10 e de preferência a 20 aminoácidos da região constante, ou que corresponda à região constante completa da imunoglobulina.

A presente invenção também diz respeito a um fragmento que compreende uma sequência repetida Pro-X, sequência repetida essa que contém pelo menos três repetições de Pro-X, representando o símbolo X qualquer aminoácido e de preferência Gln (glutamina), Lis (lisina) ou Glu (ácido glutâmico); há um fragmento repetido particular que é constituído por 12 repetições da sequência Pro-X.

Tal fragmento pode ser utilizado vantajosamente como ligação entre diferentes tipos de moléculas.

Os aminoácidos da sequência Pro-X são escolhidos entre todos os aminoácidos naturais ou não naturais.

Os fragmentos podem ser obtidos por degradação enzimática ou não enzimática das imunoglobulinas. Também podem ser obtidos por expressão, em células ou em organismos, da sequência de nucleótidos que codifica as imunoglobulinas, ou podem ser sintetizados por via química.

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

A invenção também diz respeito a anticorpos anti-idiotípicos capazes de reconhecerem os idiotipos de imunoglobulinas de cadeias pesadas.

Tais anticorpos anti-idiotípicos podem ser anticorpos singênicos ou anticorpos alogênicos ou anticorpos xenogênicos.

A invenção também diz respeito a seqüências de nucleótidos que codificam a totalidade ou uma parte de uma proteína, compreendendo essa seqüência de aminoácidos uma seqüência de péptidos seleccionados entre os seguintes:

GGSVQ TGGSLRLSCEISGLTFD
GGSVQ TGGSLRLSCAVSGFSFS
GGSEQGGSLRLSCAISGYTYG
GGSVQP GGSLTL SCTVSGATYS
GGSVQAGGSLRLSCTGSGFPYS
GGSVQAGGSLRLSCVAGFGTS
GGSVQAGGSLRLSCV SFS P S S
WGQGTQVTVSS
WGQGTLVTVSS
WGQGAQVTVSS
WGQGTQV T A S S
RGQGTQVTVSL
ALQPGGYCGYGX - - - - - C L
VSLMDRISQH - - - - - G C
VPAHLGPGA ILDLKKY - - - - - K Y
FCYSTAGDGGSGE - - - - - M Y
ELSGGSC ELP L L F - - - - - D Y
DWKYWTCGAQTGGYF - - - - - G Q
RLTEMGACDARWATLATRTFAYNY
QKKDRTRWAEPREW - - - - - N N
GSRFSSPVGSTSRLES - S D Y - - N Y
ADPSIYY S I L X I E Y - - - - - K Y
DSPCYMPTMPAPPPIRDSFGW - - D D
TSSFYWYCTTAPY - - - - - N V
TEIEWYGCNLR T T F - - - - - T R
NQLAGGWYLDPNYWLSV G A Y - - A I
RLTEMGACDARWATLATRTFAYNY
DGWTRKEGGIGLPWSVQCE D G Y N Y
DSYPCHLL - - - - - D V
VEYPIADMC S - - - - - R Y

APELLGGPSVFVFPKPKDVLSISGXPK
APELPGGPSVFVFPKPKDVLSISGRPK
APELPGGPSVFVFPKPKDVLSISGRPK
APELLGGPSVFIFFPKPKDVLSISGRPK
GQREPQVYTLAPXRLLEL
GQPREPQVYTLPPSRDEL
GQPREPQVYTLPPSREEM
GQPREPQVYTLPPSQEEM

VTVSSGTNEVCKCPKCPAPELPGGPSVFVFP

ou

VTVSSEPQIPQPKPQPKPQPKPQPKPQPKPEPECTCPKCPAPELLGGPSVFIFFP

GTNEVCKCPKCP

APELPGGPSVFVFP

EPKIPQPKPQPKPQPKPQPKPQPKPEPECTCPKCP

APELLGGPSVFIFFP

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

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

A invenção também contempla sequências de ARN, em especial as sequências de ARNm correspondentes a essas sequências de ADN e também correspondentes às sequências de ADNc.

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

Tais sequências de nucleótidos podem ser utilizadas para a preparação de vectores recombinantes e para a expressão dessas sequências, contidas nos vectores, por células hospedeiras, em especial células procarióticas, tais como células de bactérias, ou ainda por células

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

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

Isto pode ser feito ao nível do repertório de V_{HH} não rearranjado, utilizando ADN proveniente de um tipo de células ou de tecidos arbitrariamente escolhidos, ou ao nível do repertório de V_{HH} rearranjado, utilizando o ADN obtido a partir dos linfócitos B. No entanto,

é muito mais interessante transcrever o ARNm proveniente das células produtoras dos anticorpos e efectuar a clonagem de ADNc, com ou sem amplificação prévia, num vector adequado. Daqui irá resultar a obtenção de anticorpos que tenham já sido objecto de maturação por afinidade.

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

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

Estes bancos podem ser obtidos por clonagem de ADNc a partir de células linfóides, com ou sem amplificação prévia por RCP. Os iniciadores de RCP estão localizados nas sequências promotoras, líderes ou da armação estrutural do domínio V_{HH} no caso do iniciador de 5' e nas regiões de charneira, C_{H2} , C_{H3} e não traduzida em 3' ou no apêndice poli-A no caso do iniciador de 3'. Uma selecção dimensional do material amplificado permite construir um banco limitado às imunoglobulinas de cadeia pesada.

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

AG GTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG CTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG GTC CAG CTT CTC GAG TCT GG

local *XhoI*

Estes iniciadores geraram um banco de imunoglobulinas de cadeias pesadas de Camélídeos que compreendem a região V_{HH} (relacionada com o subgrupo III de murganho ou de seres humanos), a charneira e uma secção de CH_2 .

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

CTCGAGT₁₂.

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

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

Uma parte do interesse na clonagem de uma região que abranja a ligação charneira- CH_2 é o facto de haver nas duas cadeias γ_2 e γ_3 um local *Sac* imediatamente a seguir à charneira. Este local permite enxertar a sequência codificadora da região V_{HH} e a charneira na região Fc de outras imunoglobulinas, em particular nas IgG1 e IgG3 humanas que têm a mesma sequência de aminoácidos neste local (Glu₂₄₆ Leu₂₄₇).

Como exemplo, a invenção diz respeito a um banco de ADNc constituído por sequências de nucleótidos que codificam uma imunoglobulina de cadeias pesadas, tal como a que se obtém executando os passos seguintes:

- a) tratar uma amostra que contenha células linfóides, em especial linfócitos periféricos, esplenócitos, nodos linfáticos ou outros tecidos linfóides provenientes de um animal saudável, escolhido especialmente entre os Camélídeos, com a finalidade de separar as células linfóides,
- b) separar o ARN poliadenilado de outros ácidos nucleicos e de outros componentes das células,

- c) fazer reagir o ARN assim obtido com uma transcriptase reversa, com a finalidade de se obter o ADNc correspondente,
- d) fazer contactar o ADNc do passo c) com os iniciadores de 5' correspondentes ao domínio V_H do murganho, da imunoglobulina de quatro cadeias, possuindo esse iniciador um determinado local de restrição, por exemplo, o local *XhoI*, e com os iniciadores de 3' correspondentes à parte do terminal N de um domínio C_{H2} que contenha um local *KpnI*,
- e) amplificar o ADN,
- f) clonar num vector a sequência amplificada, em especial num vector 'Bluescript',
- g) recuperar os clones que hibridem com uma sonda correspondente à sequência codificadora de um domínio constante de uma imunoglobulina de cadeias pesadas que tenha sido isolada.

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

Também é possível efectuar a recuperação das sequências que codificam as imunoglobulinas de cadeias pesadas, por meio da selecção de clones que contenham as sequências de ADN que possuem um local compatível com a falta do domínio C_{H1} .

De acordo com outra variante da invenção, é possível acrescentar, entre os passos c) e d) do processo anterior, os passos seguintes:

- na presença de uma polimerase de ADN e de desoxirribonucleótido-trifosfatos, fazer contactar o referido ADNc com iniciadores oligonucleotídicos degenerados, sendo essas sequências capazes de codificar a região de charneira e o domínio V_{HH} do terminal N de uma imunoglobulina, sendo os iniciadores capazes de hibridar com o ADNc e capazes

de iniciar o prolongamento de uma sequência de ADN complementar do ADNc utilizado como matriz,

- recuperar o ADN amplificado.

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

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

AC GTG GTG GTA GTG GTA GTG ATT ATC TTA A

O vector que contém o segmento intercalar é depois digerido com *Spe*I e *Eco*RI para remover a sequência "marcadora" residente que pode ser substituída por uma sequência de

poli-His/terminação. A região V_{HH} produzida pode ser igualmente detectada utilizando anticorpos criados contra as regiões V_{HH} dos dromedários. Em condições laboratoriais, as regiões V_{HH} são produzidas no vector 'Immuno PBS' em quantidades da ordem dos mg por litro (mg/L).

A invenção também diz respeito a um banco de ADN constituído por sequências de nucleótidos que codificam uma imunoglobulina de cadeia pesada, tais como as obtidas a partir de células com genes imunoglobulínicos rearranjados.

De acordo com uma variante preferida da invenção, prepara-se o banco de ADN a partir de células de um animal previamente imunizado contra um determinado antígeno. Isto permite seleccionar anticorpos que tenham uma especificidade pré-seleccionada para o antígeno utilizado para a imunização.

De acordo com outra variante da invenção, a amplificação do ADNc não é realizada antes da clonagem do ADNc.

A cadeia pesada das imunoglobulinas de quatro cadeias permanece sequestrada na célula por uma proteína adventícia (BIP) até se combinar com uma cadeia leve. O local de ligação para a proteína adventícia é o domínio C_{H1} . Uma vez que este domínio não existe nas imunoglobulinas de cadeia pesada, a sua secreção é independente da presença da proteína BIP ou da cadeia leve. Além disso, os inventores comprovaram que as imunoglobulinas obtidas não são viscosas e consequentemente não irão agregar-se anormalmente.

A invenção também diz respeito a um processo para a preparação de um anticorpo monoclonal dirigido contra um determinado antígeno, sendo o local do anticorpo onde se liga o antígeno constituído pelas cadeias polipeptídicas pesadas e sendo ainda o referido anticorpo desprovido de cadeias polipeptídicas leves, compreendendo esse processo os passos seguintes:

- immortalizar linfócitos obtidos, por exemplo, a partir do sangue periférico de Camelídeos previamente imunizados com determinado antigénio, com uma célula imortal e de preferência com células de mieloma, para se formar um hibridoma,
- criar em cultura as células immortalizadas (hibridoma) formadas e recuperar as células produtoras de anticorpos que possuam a especificidade desejada.

A preparação de anticorpos também pode ser realizada sem uma imunização prévia de Camelídeos.

De acordo com outro processo para a preparação de anticorpos, não é necessário recorrer à técnica das células de hibridomas.

De acordo com tal processo, os anticorpos são preparados *in vitro* e podem ser obtidos por um processo que compreende os passos seguintes:

- clonar no interior de vectores, especialmente no interior de fagos e mais particularmente bacteriófagos filamentosos, sequências de ADN ou de ADNc obtidas a partir de linfócitos, especialmente os LSP (em inglês PBL) de Camelídeos previamente imunizados com determinados antigénios,
- transformar células procarióticas com os vectores supramencionados, em condições que permitam a produção dos anticorpos,
- seleccionar os anticorpos pela sua estrutura de cadeias pesadas e também submetendo-os a uma selecção por afinidade com o antigénio,
- recuperar os anticorpos que possuam a especificidade desejada.

De acordo com outra variante da invenção, efectua-se a clonagem em vectores, especialmente no interior de plasmídeos que codifiquem proteínas da membrana bacteriana. As

258
27

células procarióticas são então transformadas com os vectores anteriormente mencionados em condições que permitam a expressão dos anticorpos na sua membrana.

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

Os anticorpos de cadeia pesada que não possuam o domínio C_{H1} apresentam uma vantagem distinta nesta matéria. Com efeito, o domínio C_{H1} liga-se às proteínas adventícias de tipo BIP presentes em vectores eucarióticos e as cadeias pesadas não são transportadas para fora do retículo endocitoplásmico a não ser que estejam presentes cadeias leves. Significa isto que em células eucarióticas, a clonagem eficiente de imunoglobulinas de quatro cadeias em células que não sejam de mamíferos, tais como as células de leveduras, pode depender das propriedades das proteínas adventícias de tipo BIP residentes e por tal motivo pode ser muito difícil conseguir essa clonagem. A propósito disto, os anticorpos de cadeias pesadas da invenção que não tenham o domínio C_{H1} representam uma vantagem distintiva.

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

O gene clonado está sob o controlo do promotor *gal1* e consequentemente é induzível pela galactose. No entanto, a expressão pode ser reprimida pela glicose, o que permite obter concentrações muito elevadas de células antes da indução.

A clonagem entre locais *BamHI* e *SalI*, utilizando a mesma estratégia de produção de genes por RCP, tal como a estratégia anteriormente descrita, permite clonar genes de imunoglobulinas de Camelídeos em *E. coli*. Como exemplo de modulação metabólica que pode ser conseguida pelos anticorpos e proposta para a levedura, é possível indicar a clonagem de

anticorpos dirigidos contra as ciclinas, isto é, proteínas implicadas na regulação do ciclo celular das leveduras (TIBS 16 430 J.D. McKinney, N. Heintz 1991). Outro exemplo é a introdução, por meio de técnicas da engenharia genética, de um anticorpo dirigido contra as CD₂₈, anticorpo esse que poderia ser induzível (por exemplo, por gal1), no interior do genoma da levedura. As CD₂₈ têm uma participação ao nível da iniciação da divisão celular e por tal motivo a expressão de anticorpos contra esta molécula poderia permitir um controlo eficiente da multiplicação das células e a optimização de métodos para a produção em biorreactores ou por meio de células imobilizadas.

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

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

Além disso, começando com imunoglobulinas da presente invenção ou com os seus fragmentos é possível preparar novas imunoglobulinas ou os seus derivados.

Posto isto, é possível preparar imunoglobulinas, que satisfaçam às definições anteriormente apresentadas, contra determinados antígenos. A invenção proporciona especialmente anticorpos monoclonais ou policlonais desprovidos de cadeias polipeptídicas leves ou anti-soros que contenham tais anticorpos e que são dirigidos contra determinados antígenos, por exemplo, contra antígenos de agentes patológicos, tais como bactérias, vírus ou parasitas. Como exemplos de antígenos ou determinantes antigénicos contra os quais é possível preparar os anticorpos, é

possível citar as glicoproteínas do invólucro de vírus ou os seus péptidos, tais como a glicoproteína do invólucro externo do VIH e o antigénio da superfície do vírus da hepatite B.

As imunoglobulinas da invenção também podem ser dirigidas contra uma proteína, um hapteno, um hidrato de carbono ou um ácido nucleico.

Os anticorpos particulares de acordo com a presente invenção são dirigidos contra o epítipo de galactosil- α -1-3-galactose.

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

Como exemplo, é possível preparar a combinação de uma imunoglobulina de cadeias pesadas, portadora de um local de ligação de um antigénio que reconheça um epítipo de imunoglobulina de mieloma, com a abrina ou a toxina da lectina de visco-branco. Tal arquétipo pode ter as suas aplicações em terapias específicas de pacientes.

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

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

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

As imunoglobulinas de cadeias pesadas da presente invenção também podem ser utilizadas para a preparação de anticorpos heteroespecíficos. Isto pode ser conseguido quer de acordo com o método anteriormente descrito, por redução das pontes entre as diferentes cadeias e reoxidação, em conformidade com as técnicas habituais, de dois anticorpos que tenham especificidades diferentes, ou então pode ser conseguido efectuando a clonagem sequencial de dois anticorpos, por exemplo, no vector 'Immuno PBS'.

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

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

De acordo com uma variante particular da invenção, a região de charneira das imunoglobulinas IgG2 de acordo com a invenção é semi-rígida e por isso é adequada para o acoplamento de proteínas. Numa aplicação dessas, as proteínas ou os péptidos podem ser ligados a diversas substâncias, especialmente a ligandos, através da região de charneira utilizada como separador. De forma vantajosa, o fragmento compreende pelo menos 6 aminoácidos.

De acordo com a invenção, é interessante utilizar uma sequência que compreenda uma sequência repetida de Pro-X em que o símbolo X designa qualquer aminoácido e de preferência Gln, Lis ou Glu, em especial um fragmento constituído pelo menos por uma repetição tripla e de preferência por uma repetição dodécupla (12 vezes), para acoplar proteínas ao ligando ou para a montagem de diferentes domínios proteínicos.

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

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

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

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

Por exemplo, há outros marcadores radioactivos interessantes, entre os quais se refere o índio e em especial o índio 111, ou o iodo, em especial I^{131} , I^{125} e I^{123} .

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

Nestas aplicações, o tamanho pequeno do fragmento V_{HH} constitui uma vantagem definitiva para efeitos de penetração nos tecidos.

A invenção também diz respeito a anticorpos monoclonais que reagem com anti-idiotipos dos anticorpos descritos antes.

A invenção também diz respeito a células ou a organismos em que as imunoglobulinas de cadeias pesadas tenham sido clonadas.

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

A invenção também diz respeito a uma imunoglobulina de quatro cadeias modificada, ou seus fragmentos, cujas regiões V_H tenham sido parcialmente substituídas por sequências

específicas ou aminoácidos de imunoglobulinas de cadeias pesadas, especialmente por sequências de domínio V_{HH} . Há um domínio V_H modificado particular de uma imunoglobulina de quatro cadeias que se caracteriza pelo facto de a leucina, a prolina ou a glutamina na posição 45 das regiões V_H terem sido substituídas por outros aminoácidos e de preferência por arginina, ácido glutâmico ou cisteína.

Há um outro domínio V_H ou V_L modificado de uma imunoglobulina de quatro cadeias que se caracteriza pela ligação de elos das RDC (em inglês CDR) entre si ou às regiões da AE mediante a introdução de cisteínas emparelhadas, sendo a RDC escolhida entre a RDC_1 e a RDC_3 , e em que a região da AE é a região AE_2 , e em especial nos casos em que uma das cisteínas introduzidas está na posição 31 ou 33 da AE_2 ou na posição 45 da RDC_2 e a outra está na RDC_3 .

Em especial, a introdução de cisteínas emparelhadas é tal que o elo da RDC_3 está ligado à AE_2 ou ao domínio RDC_1 e mais especialmente a cisteína da RDC_3 da região V_H está ligada a uma cisteína na posição 31 ou 33 da AE_2 ou na posição 45 da RDC_2 .

De acordo com outra variante da invenção, é possível modificar células de plantas por meio de imunoglobulinas de cadeias pesadas de acordo com a invenção, com a finalidade de lhes conferir novas propriedades ou melhores propriedades.

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

Em tal caso, é possível conseguir a expressão de um ou dois genes de V_{HH} utilizando vectores obtidos a partir de parvovírus ou adenovírus. Os parvovírus caracterizam-se pelo facto de serem desprovidos de patogenicidade ou de praticamente não serem patogénicos para

as células humanas normais e pelo facto de serem capazes de se multiplicarem facilmente em células cancerosas (Russel S.J. 1990, Immunol. Today II, 196-200).

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

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

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

A eficiência da clonagem pode ser confirmada por transfecção. O vector que contém o anticorpo é depois introduzido em células permissivas (NB-E) por transfecção.

As células são recuperadas ao fim de 2 dias e determina-se a presença de regiões V_{HH} segundo um protocolo de EISLE, utilizando para tal anti-soro de coelho que reage com a parte de V_{HH} .

A invenção também diz respeito à preparação de anticorpos catalíticos por caminhos diferentes. A produção de anticorpos dirigidos contra componentes que simulam estados activados de substratos (por exemplo, o vanadato como componente que simula o estado activado do fosfato, com o intuito de se produzir as suas actividades de fosfoesterase, o fosfonato como composto que simula a ligação peptídica, com o intuito de se produzir proteases) permite obter anticorpos que têm uma função catalítica. Outro caminho para se obter tais anticorpos consiste em realizar uma mutagénese aleatória em clones de anticorpos, por exemplo, por RCP, introduzindo bases anormais durante a amplificação dos clones. Estes fragmentos

amplificados, obtidos por RCP, são depois introduzidos num vector adequado para clonagem. A sua expressão à superfície das bactérias permite que o substrato detecte clones que possuem actividade enzimática. Estas duas metodologias podem ser combinadas, como é evidente. Finalmente, com base nos dados disponíveis sobre a estrutura, por exemplo, os dados obtidos por cristalografia aos raios X ou por RMN, é possível comandar as modificações. Estas modificações podem ser realizadas por meio de técnicas habituais da engenharia genética ou por síntese completa. Uma vantagem da região V_{HH} das imunoglobulinas de cadeias pesadas da invenção é o facto de serem suficientemente solúveis.

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

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

FIGURAS

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

A figura 1A mostra, após redução, o perfil da proteína obtida por EGPA-DSS, das fracções adsorvida e não adsorvida de soro de *Camelus dromedarius*. A fracção adsorvida na

Proteína A e eluída com NaCl 0,15 M e ácido acético a 0,58% revelou, após redução (pista c), três componentes de cadeia pesada respectivamente com 50, 46 e 43 kd e uma cadeia leve (IgG de coelho na pista a). Às fracções adsorvidas num derivado de 'Sepharose' com Proteína G (Pharmacia), que havia sido concebido artificialmente para suprimir a região de ligação da albumina (pista e) e cuja eluição foi feita com glic-HCl 0,1 M a pH 2,7, falta-lhes a cadeia pesada de 46 kd que é recuperada na fracção não adsorvida (pista f). Não há nenhum destes três componentes na fracção não adsorvida na Proteína A (pista d); a pista b contém os marcadores de pesos moleculares.

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

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

Juntou-se 10 µL de soro, proveniente de diferentes espécies, a tubos de Eppendorf que continham 10 mg de 'Sepharose' com Proteína A ou com Proteína G, em suspensão em 400 µL de tampão de imunoprecipitação a pH 8,3 (NaCl 0,2 M, Tris 0,01 M; EDTA 0,01M, 'Triton X100' a 1% e ovalbumina a 0,1%). Manteve-se estes tubos a rodar lentamente durante 2 horas a 4°C. Após a centrifugação, as massas obtidas foram lavadas três vezes em tampão e uma vez em tampão em que não havia 'Triton' nem ovalbumina. As massas obtidas foram depois recolocadas em suspensão na solução de amostra de EGPA-DSS, sendo utilizados 70 µL por cada massa na presença ou na ausência de ditioneitol enquanto agente redutor. Depois de se manter em ebulição durante 3 minutos a 100°C, efectuou-se a centrifugação dos tubos e fez-se uma análise dos sobrenadantes. Em todas as espécies examinadas as fracções não reduzidas (A) continham também, para além das moléculas de aproximadamente 170 kd, componentes importantes mais pequenos de aproximadamente 100 kd. Na amostra reduzida (B) são detectadas as cadeias pesadas e leves constituintes. Há em todas as espécies um componente de cadeia pesada (marcado com um asterisco (*)) que se encontra presente no material resultante da eluição da Proteína A, mas que não existe no material da eluição da Proteína G.

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

Figura 3A. Acrescentou-se lisado de antigénios de *Trypanosoma evansi* marcados com ^{35}S -metionina (500 000 unidades de contagem) a tubos de Eppendorf que continham 10 μL de soro ou 20 μg de IgG_1 , IgG_2 e IgG_3 em 200 μL de tampão de imunoprecipitação a pH 8,3 que continha TLCK 0,1 M, enquanto inibidor das proteinases, e manteve-se os tubos a rodar lentamente a 4°C durante 1 hora. Os tubos foram depois enriquecidos com 10 mg de 'Sepharose' com Proteína A em suspensão em 200 μL do mesmo tampão a pH 8,3 e ficaram a incubar a 4°C durante mais 1 hora.

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

Figura 3B. Separou-se 20 μg de IgG_1 , IgG_2 e IgG_3 provenientes de animais saudáveis e de animais infectados com tripanossomas, recorrendo ao protocolo de EGPA-DSS, sem redução prévia nem aquecimento. As amostras separadas foram então electrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, contrastou-se uma parte da membrana com o corante vermelho de Ponceau para se localizar o material proteínico e a parte restante ficou a incubar com ovalbumina a 1% em tampão TST (Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween a 0,05%) para bloquear os locais de ligação das proteínas.

Após o bloqueio, lavou-se a membrana exaustivamente com tampão TST e manteve-se a incubar durante 2 horas com antigénio de tripanossomas marcado com ^{35}S . Depois de uma

lavagem exaustiva, secou-se a membrana e analisou-se por autorradiografia. Para se evitar a ligação natural e de tipo não específico, o lisado de tripanossomas marcado foi filtrado através de um filtro de miliporos de 45 μm e manteve-se a incubar com imunoglobulina de camelo saudável e ovalbumina adsorvida sobre uma membrana de nitrocelulose.

Figura 4: a IgG_3 de camelo purificada por cromatografia de afinidade sobre 'Sephrose' com Proteína A é parcialmente digerida com papaína e separada sobre 'Sephrose' com Proteína A

Dissolveu-se 14 mg de IgG_3 purificada em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,0 que continha EDTA 2 mM. Fez-se digerir soro de leite coalhado por incubação durante 1 hora a 37°C com a enzima mercuropapaína (proporção de 1% entre enzima e proteína) activada por cisteína 5×10^4 M. Bloqueou-se a digestão por adição de um excesso de iodoacetamida (4×10^2 M) (13). Após a centrifugação do produto de digestão numa centrifugadora de Eppendorf durante 5 minutos a 15 000 r.p.m., efectuou-se a separação dos fragmentos de papaína numa coluna de 'Sephrose' com Proteína A, em fracções ligantes (L) e não ligantes (NL). A eluição da fracção ligante teve lugar a partir da coluna com tampão de glicina-HCl 0,1 M a pH 1,7.

Figura 5: representação esquemática de um modelo para as moléculas de IgG_3 desprovidas de cadeias leves.

Figura 6:

- representação esquemática de imunoglobulinas que possuem cadeias polipeptídicas pesadas e desprovidas de cadeias leves, tendo em conta a imunoglobulina do modelo convencional de quatro cadeias;
- representação de uma região de charneira.

Figura 7: alinhamento de 17 sequências de ADN de V_{HH} de imunoglobulinas de cadeias pesadas do camelo.

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

I ANTICORPOS DE CADEIAS PESADAS NOS CAMELÍDEOS

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

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

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

que se liga à Proteína G, IgG₂ (γ₂ (46 kd) de cadeias pesadas) que não se liga à Proteína G e IgG₃ (γ₃ (43 kd) de cadeias pesadas) que se liga à Proteína G. Há a possibilidade de estas três subclasses ainda poderem ser subdivididas.

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

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

Para o efeito, preparou-se as fracções correspondentes de IgG₁, IgG₂ e IgG₃ a partir de soro de um camelo saudável e a partir de soro de camelos com uma elevada concentração de anti-tripanosossoma, medida em conformidade com o 'Card Agglutination Test' (3). No ensaio de radioimunoprecipitação, demonstrou-se que as IgG₁, IgG₂ e IgG₃, obtidas a partir de camelos infectados, indicando o repertório extenso de heterogeneidade e de complexidade (figura 3A), se ligam a um grande número de antígenos presentes num lisado de tripanossomas marcado com ³⁵S-metionina.

Em experiências de obtenção de autorradiografias, o lisado de tripanossomas marcado com ^{35}S -metionina liga-se às IgG_1 , IgG_2 e IgG_3 , separadas por EGPA-DSS, provenientes de animais infectados (figura 3B).

Isto levou-nos a concluir que as IgG_2 e IgG_3 de cadeias pesadas dos Camelídeos são anticorpos que se ligam a antigénios genuínos.

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

As imunoglobulinas de cadeias pesadas do camelo parecem contradizer este paradigma.

As imunoglobulinas são caracterizadas por um padrão de focagem isoeléctrica (FIE) complexo, que reflecte a sua heterogeneidade extrema. Para se determinar se as duas cadeias pesadas que constituem as IgG_2 e IgG_3 são idênticas ou não, efectuou-se uma observação do padrão de focagem isoeléctrica (FIE) antes e depois da separação das cadeias por redução e alquilação, utilizando como agente de alquilação a iodoacetamida.

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

Após a redução e a alquilação com iodoacetamida, o padrão observado não é modificado no caso das IgG_2 e IgG_3 de *Camelus dromedarius*, o que indica que cada uma destas moléculas é constituída por duas cadeias pesadas idênticas que migram para a mesma posição para que migra a molécula não reduzida onde tiveram a sua origem.

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

Normalmente, a cadeia pesada isolada a partir de imunoglobulinas de mamíferos tem tendência para se agregar de forma considerável, mas apenas é solubilizada pelas cadeias leves (8, 9) que se ligam ao domínio C_{H1} da cadeia pesada.

Nos seres humanos e nos murganhos há diversos mielomas espontâneos ou induzidos que produzem uma imunoglobulina patológica constituída exclusivamente por cadeias pesadas (doença das cadeias pesadas). Estas cadeias pesadas das proteínas dos mielomas contêm supressões nos domínios C_{H1} e V_{HH} (10). O motivo pelo qual as cadeias pesadas de comprimento completo não originam cadeias pesadas segregadas em tais imunoglobulinas patológicas parece ficar a dever-se ao facto de a síntese de Ig necessitar de uma proteína adventícia, a proteína de ligação de cadeias pesadas da imunoglobulina ou BIP (11), que é normalmente substituída pela cadeia leve (12). É possível que o papel primordial da cadeia leve nas imunoglobulinas do modelo de quatro cadeias seja o de uma proteína adventícia de cadeia pesada comprometida e que a emergência dos repertórios de cadeias leves tenha sido mesmo um bônus evolutivo.

As cadeias γ_2 e γ_3 dos Camelídeos são consideravelmente mais curtas do que a cadeia γ normal dos mamíferos. Isto poderia sugerir a hipótese de terem ocorrido supressões no domínio C_{H1}. As diferenças dos tamanhos das imunoglobulinas γ_2 e γ_3 dos Camelídeos do velho mundo e

do novo mundo sugerem que as supressões ocorreram em diversos passos evolutivos, especialmente no domínio C_{H1} .

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

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

Uma combinação de digestão com papaína e cromatografia por afinidade com Proteína A permitiu fazer a separação de diversos fragmentos que fornecem informação sobre a estrutura geral da IgG_3 .

A IgG_3 do camelo (*Camelus dromedarius*), purificada por cromatografia de afinidade sobre 'Sepharose' com Proteína A, foi parcialmente digerida com papaína e o produto da digestão foi separado sobre 'Sepharose' com Proteína A, tendo sido obtidas as fracções de ligação e de não ligação. Estas fracções foram analisadas por EGPA-DSS em condições redutoras e não redutoras (figura 4).

A fracção ligada continha dois componentes, um de 28 kd e um de 14,4 kd, para além do material não clivado ou parcialmente clivado. Essas fracções foram bem separadas por

electroforese em gel (a partir de geles preparativos de EGPA-DSS a 19%), em condições não redutoras, e foram ainda purificadas melhor por electroeluição (em bicarbonato de amónio 50 nM e DSS a 0,1% (p/v), utilizando um dispositivo de electroeluição da 'BioRad'). Após a liofilização destas fracções electroeluídas, eliminou-se a parte remanescente do DSS fazendo precipitar a proteína por adição de etanol a 90% e misturando e mantendo a mistura a incubar de um dia para o outro a -20°C (14). A proteína precipitada foi recolhida numa massa combinada por centrifugação (15 000 r.p.m. durante 15 minutos) que foi utilizada para a sequenciação proteínica. Efectuou-se a sequenciação do terminal N utilizando a química de Edman para um sequenciador automático de proteínas em fase líquida, em regime pulsatório, da 'Applied Biosystem 477A'. Os aminoácidos foram identificados pelos seus derivados de fenil-tio-hidantoína (PTH), tendo para tal sido utilizado o analisador de modelo 120 PTH da Applied Biosystem. Todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos à empresa Applied Biosystem. A análise dos dados cromatográficos foi realizada utilizando a versão informática 1.61 da Applied Biosystems. Em todos os casos, a análise das sequências, auxiliada por computador, foi confirmada por inspecção directa dos cromatogramas resultantes do analisador de PTH. Dissolveu-se amostras da proteína sequenciada alternativamente em ácido trifluoroacético (ATF) a 50% (v/v) (fragmento de 28 kd) ou em ATF a 100% (fragmento de 14 kd). As amostras de equivalente proteínico dissolvido para 2000 pmol (fragmento de 28 kd) ou para 500 pmol (fragmento de 14 kd) foram aplicadas sobre discos de fibras de vidro, tratados com ATF. Os discos de fibras de vidro foram recobertos com BioBerne (3 mg) e tratados em pré-ciclo uma vez antes da sua utilização.

A sequenciação do terminal N do fragmento de 28 kd gera uma sequência homóloga da parte do terminal N do domínio γ_{CH2} e portanto homóloga da extremidade do terminal N

do fragmento Fc. A sequência do terminal N do fragmento de 14,4 kd corresponde à última lisina de um domínio γ_{C_H2} e à extremidade do terminal N de um domínio γ_{C_H3} (quadro 1). O peso molecular (PM) dos fragmentos obtidos com papaína e a identificação das suas sequências do terminal N leva-nos a concluir que os domínios C_{H2} e C_{H3} das cadeias pesadas γ_3 têm um tamanho normal e que a supressão deve ocorrer quer no domínio C_{H1} quer no domínio V_{HH} para gerar a cadeia γ_3 mais curta. As fracções que não se ligam à 'Sephrose' com Proteína A contêm duas bandas de 34 kd e 17 kd que são mais difusas no EGPA-DSS, indicando isso que a sua origem está na parte variável do terminal N da molécula (figura 4).

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

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

Demonstrou-se que os esplenócitos de camelo marcam as células que reagiram com os soros de coelho e com os soros anti-imunoglobulina de camelo e que por tal motivo o baço é um local de síntese, pelo menos de uma classe de imunoglobulinas. O ADNc foi pois sintetizado a partir de ARNm do baço de camelo. As condições para o isolamento do ARN foram as seguintes: isolou-se ARN total a partir de baço de dromedário, pelo método do isotiocianato de guanidínio (15). Purificou-se o ARNm com esférulas paramagnéticas-oligoT.

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

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

Os iniciadores degenerados, contendo os locais *EcoRI* e *KpnI*, foram ainda clonados no interior do pUC18. Após um tratamento de desnaturação e de recombinação (a 94°C durante 5 minutos e a 54°C durante 5 minutos), acrescentou-se 2 unidades de polimerase de ADN de Taq à mistura de reacção antes de a submeter a 35 ciclos de amplificação: 1 minuto a 94°C (desnaturar), 1 minuto a 54°C (recombinar) e 2 minutos a 72°C (alongar). Para se amplificar as sequências de ADN entre os domínios V_{HH} e C_{H2} (clones da série nº 72), efectuou-se a RCP nas mesmas condições com a excepção de se ter aumentado para 60°C a temperatura de recombinação.

Um dos clones examinados (#56/36) tinha uma sequência correspondente à parte do terminal N de um domínio C_{H2} idêntico à sequência do fragmento de 28 kd. A disponibilidade de dados desta sequência permitiu construir um iniciador de 3' exacto e a clonagem da região da extremidade do terminal N entre os domínios V_{HH} e C_{H2}.

Os iniciadores de 5', correspondentes ao domínio V_{HH} de murganho (16) e que contêm um local de restrição *XhoI*, foram utilizados em conjunto com o iniciador de 3' em que havia sido inserido um local *KpnI* e as sequências amplificadas foram clonadas no interior do vector 'pBluescript®'. Fez-se digerir o clone #56/36, que havia revelado dois locais internos *HaeIII*, com esta enzima para se obter uma sonda para identificar os clones positivos na RCP.

Após a amplificação, os produtos da RCP foram confirmados sobre um gel de agarose a 1,2% (p/v). A limpeza dos produtos da RCP consistiu numa extracção com fenol-clorofórmio a

que se seguiu outra purificação por CLER (coluna de tipo 'GEN-PAC FAX', Waters) e finalmente mediante a utilização do estojo 'MERMAID' ou 'GENECLEAN II', (BIO 101, Inc.). A seguir a estes passos de purificação, fez-se digerir então o ADNc amplificado, tendo a digestão sido feita com *EcoRI* e *KpnI* para os clones da série nº 56 e com *XhoI* e *KpnI* para os clones da série nº 72. Fez-se uma extracção final com fenol-clorofórmio a anteceder a ligação no interior do pUC18 (clones da série nº 56) ou no interior de 'pBluescript' (clones da série nº 72).

Todos os clones obtidos tinham menos do que os 860 pares de bases que seria de esperar se possuíssem uma região completa V_{HH} e C_{H1} . Os dados parciais da sequência, correspondentes ao terminal N da região V_{HH} , revelam que em 20 clones havia 3 que eram idênticos e possivelmente não eram independentes. As sequências obtidas assemelham-se ao subgrupo III humano e aos subgrupos IIIa e IIIb dos murinos (quadro 2).

Foram obtidos clones correspondentes a dois conjuntos diferentes de sequências de proteínas de domínio C_{H2} . Um primeiro conjunto de sequências (#72/41) possuía uma região C_{H2} do terminal N idêntica àquela que foi obtida por sequenciação dos fragmentos de 28 kd da cadeia pesada γ_3 das proteínas, obtidos com papaína, possuía uma região de charneira curta com 3 resíduos cisteína e uma região variável correspondente aos resíduos da armação estrutural (AE4, em inglês FR4) codificados pelos minigenes J adjacentes à charneira. Faltava-lhes totalmente o domínio C_{H1} . Este ADNc corresponde à cadeia γ_3 (quadro 4).

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

A sequência correspondente à região C_{H3} e a parte restante da região C_{H2} foram obtidas por RCP realizada com o ADNc, utilizando como iniciador de *KpnI* um poli-T em cuja extre-

midade 5' foi inserido um local de restrição *KpnI*. A sequência total da cadeia $\gamma 3$ corresponde a um peso molecular (PM) que concorda bastante bem com os dados obtidos com o protocolo de EGPA-DSS.

A sequência desta cadeia $\gamma 3$ apresenta semelhanças com outras cadeias $\gamma 7$, com a exceção de lhe faltar o domínio C_{H1} , estando o domínio V_{HH} adjacente à charneira.

Um, ou a totalidade dos três resíduos cisteína, pode provavelmente ser responsável por manter unidas as duas cadeias $\gamma 3$.

Estes resultados permitiram-nos definir um modelo para a molécula IgG_3 , com base na sequência e clivagem com papaína (figura 5). A papaína pode clivar a molécula em cada lado das pontes dissulfureto da charneira e também entre os domínios C_{H2} e C_{H3} . Em condições não redutoras, os domínios V_{HH} da IgG_3 podem ser isolados sob a forma de um dímero ligado por pontes dissulfureto ou sob a forma de um monómero, consoante o local onde a papaína realize a clivagem.

Há um segundo conjunto de clones #72/29 que tem uma sequência ligeiramente diferente para o domínio C_{H2} e que foi caracterizado por uma charneira muito comprida precedida imediatamente pelo domínio variável. Esta região da charneira possui três resíduos cisteína na extremidade do seu terminal C numa sequência homóloga com a da charneira $\gamma 3$. Esse segundo conjunto de clones pode representar eventualmente a subclasse de IgG_2 . Para a parte constante da cadeia $\gamma 3$ e também para a cadeia $\gamma 2$ putativa, a maior parte dos clones são idênticos, revelando sequências específicas das cadeias $\gamma 2$ ou $\gamma 3$. No entanto, há alguns clones, tais como o #72/1, que revelam diferenças menos significativas. Por exemplo, no caso dos clones #72/1, são detectadas duas diferenças nos nucleótidos.

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

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

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

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

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

A presença de uma classe de IgG1 nos camelos, constituída por cadeias pesadas e leves que representam uma quantidade compreendida entre 25% e 50% das moléculas totais de IgG, levanta também o problema do modo como a maturação e o desvio de classe ocorre e ainda sobre o papel desempenhado pela cadeia leve. A cadeia leve dos Camelídeos parece ser invulgarmente grande e heterogénea quando examinada por EGPA-DSS.

A maior dimensão de um domínio isolado é de 40 Å e o intervalo máximo que se consegue entre os locais de ligação de uma IgG convencional com domínios C_{H1} e V_{HH} irá ser da ordem de 160 Å ($2V_{HH} + 2C_{H1}$) (19). A supressão do domínio C_{H1} nos dois tipos de anticorpos de cadeias pesadas desprovidos de cadeias leves, já sequenciados, tem consequentemente uma modificação do seu intervalo máximo (figura 6). Na IgG_3 a distância máxima entre as extremidades das regiões V_{HH} irá ser da ordem de 80 Å ($2V_{HH}$). Isto poderia ser uma grave limitação à aglutinação ou à interligação. Na IgG_2 isto é compensado pelo troço extremamente longo da charneira, constituído por uma repetição, que ocorre 12 vezes, da sequência Pro-X (em que o símbolo X representa Gln, Lis ou Glu) e que fica localizada do lado do terminal N em relação às pontes dissulfureto da charneira. Pelo contrário, na IgG_3 humana, a charneira muito comprida que aparentemente surge também como resultado de duplicação das sequências, não contribui para aumentar a distância existente entre os dois locais de ligação, uma vez que esta charneira está intercalada com pontes dissulfureto.

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

Ao contrário das cadeias pesadas dos mielomas, que resultam provavelmente da supressão do domínio C_{H1} numa célula produtora de um anticorpo singular, ou de anticorpos de cadeias pesadas produzidos por clonagem de expressão (15), os anticorpos de cadeias pesadas dos Camelídeos (desprovidos de cadeias leves) surgiram num ambiente imunológico normal e presume-se que tenham experimentado um refinamento selectivo em termos da especificidade e da afinidade associadas à maturação das células B.

● Expressão e purificação da proteína V_{HH21} do camelo (RD21 na figura 7), a partir de *E. coli*

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

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

- A estirpe JM101 de *E. coli*, que acomoda o plasmídeo ipBS-V_{HH}21, desenvolveu-se em 1 L de meio constituído por CT (em inglês TB) com ampicilina na concentração de 100 µg/mL e 0,1% de glicose a 32°C. A expressão foi induzida pela adição de IPTG 1 mM (concentração final) para um valor da DO₅₅₀ igual a 1,0. Após a indução de um dia para o outro a 28°C, efectuou-se a colheita das células por centrifugação a 4000 x g durante 10 minutos (4°C), tendo sido recolocadas em suspensão em 10 mL de tampão TES (Tris 0,1 M-HCl a pH 8,0, EDTA 0,5 mM e sacarose 0,5 M). Manteve-se a suspensão em gelo durante 2 horas. Efectuou-se a remoção das proteínas periplásmicas por choque osmótico mediante a adição de 20 mL de tampão TES diluído a 1:4 v/v com água, manteve-se em gelo durante 1 hora e depois centrifugou-se a 12 000 x g durante 30 minutos a 4°C. Efectuou-se a diálise da fracção periplásmica do sobrenadante em presença de Tris-HCl a pH 8,8, NaCl 50 mM, aplicou-se a uma coluna de escoamento rápido de tipo 'Q-Sepharose' (Pharmacia), lavou-se com o tampão anteriormente referido e realizou-se a eluição com um gradiente linear de NaCl a variar desde 50 mM até 1 M no tampão.

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

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

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

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

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

			250		260		270	
Camelo I	γ_3 28Kd	-	L P G G P S V F V F P P K P K D V L S I X G X P	-		-		-
Clone	# 72/1	-	L P G G P S V F V F P T K P K D V L S I S G R P	-		-		-
Clone	# 72/4	-	L P G G P S V F V F P P K P K D V L S I S G R P	-		-		-
Clone	# 72/29	-	L L G G P S V F I F P P K P K D V L S I S G R P	-		-		-
Seres humanos	$\gamma_1\gamma_3$	-	L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P	-		-		-
C _{H2}	γ_2	-	V A - G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P	-		-		-
	γ_4	-	F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P	-		-		-

			C _{H2} C _{H3}	
			360	370
Camelo	γ_3 14Kd	-	K G Q T R E P Q V Y T L A P X R L E L	- -
Seres humanos	γ_1	-	K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L	- -
C _{H2} /C _{H3}	γ_2, γ_3	-	K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M	- -
	γ_4	-	K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M	- -

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

		10		20		30	
Iniciador derivado		G G S V Q T G G S L R L S C E I S G L T F D					# 72/4
		G G S V Q T G G S L R L S C A V S G F S F S					# 72/3
		G G S E Q G G G S L R L S C A I S G Y T Y G					# 72/7
		G G S V Q P G G S L T L S C T V S G A T Y S					# 72/17
		G G S V Q A G G S L R L S C T G S G F P Y S					# 72/18
	D V Q L V A S G G G S V G A G G S L R L S C T A S G D S F S						# 72/2
	E V K L V E S G G G L V E P G G S L R L S C A T S G F T F S						V _H IIIa demurganho
	E V Q L L S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S						V _H II do ser humano

Quadro 2
 Comparação das regiões Fr 1 do terminal N da V_{HH} do camelo com a proteína do subgrupo V_HIII dos seres humanos e com a proteína do subgrupo V_HIIIa do murganho.
 Os resíduos específicos do subgrupo invariável estão acidentados.

10	20	40
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL SCAASG	CDR1: WVRQA PGKGLEWVS CDR2:
GG SVQGGGSLRL	SCAISG	CDR1: WFREG PGKEREGIA CDR2:
GG SVQAGGSLRL	SCASSS	CDR1: WYRQA PGKEREFVS CDR2:

70	80	90	110
RFTIS RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDTAVY YCAR	CDR3: WGQGTQVT VSS	
RFTIS QDSTLKTMYL	LMNNLKPEDTGT YCAA	CDR3: WGQGTQVT VSS	
RFTIS QDSAKNTVYL	QMNSLKPEDTAMY YCKI	CDR3: WGQGTQVT VSS	

	V _{HH} do camelo	charneira	C _H 2
camelo	WGQGTQVT VSS	GTNEVCKCPKCP	APELPGG PSVFVFP
	WGQGTQVT VSS	<u>EPKIPQPQPKPQPQ</u>	
		<u>QPQPKPQP</u>	
		<u>KPEPECTCPKCP</u>	APELLGG PSVFIFP

Quadro 5(1)

	Ch1 humano	charneira	C _H 2
γ3 humana	KVDKRV	ELKTPLGDTTHTCPRCP	
		<u>EPKCSDTPPPCCPRCP</u>	
		<u>EPKCSDTPPPCCPRCP</u>	APELLGG PSVFLFP
γ1 humana	KVDKRV	AEPKSCDKTHTCPCP	APELLGG PSVFLFP
γ2 humana	KVRVTV	ERKCCVBCPPCP	APPVAG - PSVFLFP
γ4 humana	KVDKRV	ESKYGPPCPSCP	APFLGG PSVFLFP

Quadro 5(2)

REFERÊNCIAS

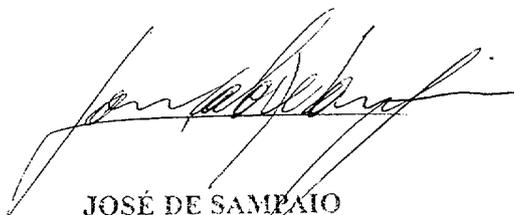
1. Ward, E.S., Gussow, D., Griffiths, A.D., Jones, P.T. e Winter, G, Nature 341, 544-546 (1989).
2. Ungar-Waron H., Eliase E., Glukman A. e Trainin Z. Isr. J. Vet. Med., 43, 198-203 (1987).
3. Bajyana Songa E. e Hamers R., Ann. Soc. Belge Med. Trop., 68, 233-240 (1988).
4. Edelman G.M., Olins D.E., Gally J.A. e Zinder N.D., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 753 (1963).
5. Franek F. e Nezlin R.S., Biokhimiya, 28, 193 (1963).
6. Roitt I.M., Brostoff J. e Male D.K., Immunology, Gower Med. Pub, Londres, Nova Iorque, p. 9.2. (1985).
7. Schifer M., Girling R.L., Ely K.R. e Edmundson B., Biochemistry, 12, 4620-4631 (1973).
8. Fleischman J.B., Pain R.H. e Porter R.R., Arch. Biochem. Biophys., Supl. 1, 174 (1962).
9. Roholt O., Onoue K. e Pressman D., PNAS 51, 173-178 (1964).
10. Seligmann M., Mihaesco E., Preud'homme J.L., Danon F. e Brouet J.C., Immunological Rev., 48, 145-167 (1979).
11. Hendershot L., Bole D., Köhler G. e Kearney J.F., The Journal of Cell Biology, 104, 761-767 (1987).
12. Hendershot L.M., The Journal of Cell Biology, 111, 829-837 (1990).
13. Hamers-Casterman, C., E. Wittouck, W. Van der Loo e R. Hamers, Journal of Immunogenetics, 6, 373-381 (1979).

14. Applied Biosystems - Ethanol Precipitation of Electro Eluted Electrolysed Sample, Publicação n° 27.
15. Maniatis, T., E.F. Fritsch e J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1988).
16. Sastry *et al.*, PNAS, 86, 5728 (1989).
17. Sanger, F., S. Nicklen e A.R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 74, 5463-5467 (1977).
18. Kabat E.A., Tai Te Wu, M. Reid-Miller, H.M. Perry e K.S. Gottesman, U.S. Dpt of health and Human Services, Public health Service, National Institutes of Health (1987).
19. Valentine, R.C. e N.M. Geen, J.M.B., 27, 615-617 (1967).

Lisboa, 19 de Setembro de 2001



Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.

Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1269-063 LISBOA

Reivindicações

1. Imunoglobulina caracterizada pelo facto de possuir duas cadeias polipeptídicas pesadas capazes de reconhecerem e de se ligarem a um ou a vários antigénios, em que as cadeias polipeptídicas pesadas são desprovidas do chamado primeiro domínio na sua região constante (C_H1), sendo esta imunoglobulina desprovida de cadeias polipeptídicas leves.
2. Imunoglobulina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo facto de possuir duas cadeias polipeptídicas pesadas capazes de reconhecerem e de se ligarem a um ou a vários antigénios e pelo facto de a sequência de aminoácidos da sua região variável conter na posição 45 um aminoácido que é escolhido entre os aminoácidos com carga eléctrica ou é um resíduo cisteína.
3. Imunoglobulina de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo facto de possuir duas cadeias polipeptídicas pesadas suficientes para a formação de um local de ligação de um antigénio completo ou de vários locais de ligação de antigénios, sendo esta imunoglobulina também desprovida de cadeias polipeptídicas leves e caracterizada ainda pelo facto de ser o produto da expressão, numa célula hospedeira procariótica ou eucariótica, de um ADN ou de um ADNc que codifica a sequência de uma imunoglobulina desprovida de cadeias leves, susceptível de ser obtida a partir dos linfócitos ou de outras células dos Camelídeos.
4. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo facto de possuir um local de ligação do antigénio ou vários locais de ligação dos

28

antigénios e especialmente pelo facto de cada região variável de cada cadeia pesada conter pelo menos um local de ligação do antigénio.

5. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo facto de ser uma imunoglobulina de tipo G e de classe 2 (IgG2) ou ser uma imunoglobulina de tipo G e de classe 3 (IgG3).
6. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo facto de ser uma imunoglobulina de um Camelídeo.
7. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, susceptível de ser obtida por purificação a partir do soro de Camelídeos, caracterizada pelos factos seguintes:
 - não é adsorvida por cromatografia na coluna de 'Sepharse' com Proteína G,
 - é adsorvida por cromatografia numa coluna de 'Sepharse' com Proteína A,
 - possui um peso molecular de cerca de 100 kd após a eluição com uma solução tampão a pH 4,5 (NaCl 0,15 M com ácido acético a 0,58%, ajustada para o valor de pH igual a 4,5 com NaOH),
 - é constituída por cadeias polipeptídicas γ_2 pesadas com um peso molecular de cerca de 46 kd e preferencialmente 45 kd após redução.
8. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, susceptível de ser obtida por purificação a partir do soro de Camelídeos, caracterizada pelos factos seguintes:
 - é adsorvida por cromatografia numa coluna de 'Sepharse' com Proteína A,

258

- ter um peso molecular de cerca de 100 kd após a eluição com uma solução tampão a pH 3,5 (NaCl 0,15 M com ácido acético a 0,58%),
- é adsorvida por cromatografia numa coluna de 'Sepharose' com Proteína G e a sua eluição tem lugar com uma solução tampão a pH 3,5 (NaCl 0,15 M e ácido acético a 0,58%),
- é constituída por cadeias polipeptídicas γ_3 pesadas com um peso molecular de cerca de 45 kd e em particular compreendido entre 43 kd e 47 kd após redução.

9. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelos factos seguintes:

- possui 4 armações estruturais na sua região variável, possuindo essas armações estruturais uma sequência de aminoácidos seleccionada entre o conjunto seguinte de sequências:

para o domínio da armação estrutural 1

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

para o domínio da armação estrutural 4

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

e/ou

para o domínio da RDC3

```

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

```

e/ou

- a sua região constante possui os domínios C_{H2} e C_{H3} que compreendem uma sequência de aminoácidos seleccionada entre o conjunto seguinte de sequências:

para o domínio C_{H2}:

```

APELLGGPTVFIFPPKPKDVLSITLTP
APELPGGPSVVFVPTKPKDVLSISGRP
APELPGGPSVVFVPPKPKDVLSISGRP
APELLGGPSVVFIFPPKPKDVLSISGRP

```

para o domínio C_{H3}:

```

GQTREPQVYTLA
GQTREPQVYTLAPXRLEL
GQPREPQVYTLPPSRDEL
GQPREPQVYTLPPSREEM
GQPREPQVYTLPPSQEEM

```

e/ou

238

- a sua região de charneira possui entre 0 e 50 aminoácidos, e especialmente pelo facto de a sua região de charneira possuir uma sequência de aminoácidos seleccionada entre as sequências seguintes:

GTNEVCKCPKCP

ou

EPKIPQPQPKPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP.

10. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo facto de ser codificada por uma sequência seleccionada entre as representadas na figura 7.
11. Fragmento que corresponde a um polipeptido de uma cadeia pesada de uma imunoglobulina, o qual contém um resíduo aminoácido na posição 45 da referida cadeia pesada que é um aminoácido com carga eléctrica ou um resíduo cisteína, formando o referido fragmento um determinado local de ligação do antigénio.
12. Fragmento que possui pelo menos 10 resíduos aminoácidos da região variável da cadeia pesada de uma imunoglobulina, incluindo um resíduo aminoácido na posição 45 da referida cadeia pesada, sendo esse resíduo um aminoácido com carga eléctrica ou um resíduo cisteína.
13. Fragmento de acordo com a reivindicação 12, o qual possui pelo menos 20 resíduos aminoácidos.

288

14. Fragmento de acordo com uma das reivindicações 12 ou 13, o qual é a região variável da cadeia pesada de uma imunoglobulina, formando esse fragmento um determinado local de ligação do antígeno.

15. Fragmento de uma imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo facto de ser seleccionado entre o conjunto seguinte:
 - fragmentos obtidos por digestão enzimática das imunoglobulinas da invenção, em especial aqueles que são obtidos por digestão parcial com papaína, dando origem ao fragmento Fc (fragmento constante) e dando origem ao fragmento $FV_{HH}h$ (que contém locais das cadeias pesadas onde se ligam os antígenos) ou o seu dímero $F(V_{HH}h)_2$ ou um fragmento obtido por meio de outra digestão do fragmento Fc com papaína, dando origem ao fragmento Fc' correspondente à parte do terminal C do fragmento Fc,
 - fragmentos homólogos obtidos com outras enzimas proteolíticas,
 - um fragmento correspondente à região de charneira da imunoglobulina, ou correspondente pelo menos a 6 aminoácidos desta região de charneira,
 - um fragmento da região de charneira que possua uma sequência repetida de Pro-X, em que o símbolo X representa um resíduo aminoácido com excepção de Glu.

16. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo facto de a totalidade ou uma parte da sua região constante ser substituída pela totalidade ou por uma parte da região constante de um anticorpo humano.

17. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 10, susceptível de ser obtida em células procarióticas, especialmente em células de *E. coli*, por um processo que compreende os passos seguintes:

258

- a) efectuar a clonagem, num vector 'Bluescript', de uma sequência de ADN ou de ADNc que codifique o domínio V_{HH} de uma imunoglobulina desprovida de cadeias leves, susceptível de ser obtida, por exemplo, a partir dos linfócitos de Camelídeos,
- b) recuperar o fragmento clonado após a amplificação, utilizando um iniciador de 5' que contém um local *Xho* e um iniciador de 3' que contém o local *Spe* que possui a sequência seguinte:

TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG,

- c) clonar o fragmento recuperado em fase no vector 'immuno PBS' após a digestão do vector com as enzimas de restrição *Xho* e *Spe*,
- d) transformar células hospedeiras, especialmente de *E. coli*, por transfecção com o vector 'Immuno PBS' recombinante do passo c,
- e) recuperar o produto de expressão da sequência de codificação V_{HH} , por exemplo, utilizando anticorpos criados contra o domínio V_{HH} dos dromedários.

18. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 10 susceptível de ser obtida em células procarióticas por meio de um processo que compreende os passos seguintes:

- a) efectuar a clonagem, num vector 'Bluescript', de uma sequência de ADN ou de ADNc que codifique o domínio V_{HH} de uma imunoglobulina desprovida de cadeias leves, susceptível de ser obtida, por exemplo, a partir dos linfócitos de Camelídeos,
- b) recuperar o fragmento clonado após a amplificação, utilizando um iniciador de 5' que contém um local *Xho* que possui uma sequência seleccionada entre as seguintes:

AG GTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

258

AG CTC CAG CTG CTC GAG TCT GG

AG GTC CAG CTT CTC GAG TCT G

e utilizando um iniciador de 3' que contém um local *KpnI* que possui a sequência seguinte:

CGT CAT CAA GGT AAC AGT TGA

e

- c) clonar o fragmento recuperado em fase no vector 'immuno PBS' após a digestão do vector com as enzimas de restrição *Xho* e *Spe*,
- d) transformar células hospedeiras, especialmente de *E. coli*, por transfecção com o vector 'Immuno PBS' recombinante do passo c,
- e) recuperar o produto de expressão da sequência de codificação V_{HH} por exemplo, utilizando anticorpos criados contra o domínio V_{HH} dos dromedários.

19. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 10, susceptível de ser obtida por meio de um processo que compreende os passos seguintes:

- obter uma primeira sequência de ADN ou de ADNc que codifique um domínio V_{HH} ou uma parte sua, que tenha uma especificidade determinada contra um determinado antígeno e que esteja compreendido entre os locais *Xho* e *Spe*,
- obter uma segunda sequência de ADN ou de ADNc que codifique um domínio V_{HH} ou uma parte sua, que possua uma especificidade determinada diferente da especificidade da primeira sequência de ADN ou de ADNc, e que esteja compreendido entre os locais *Spe* e *EcoRI*,
- fazer digerir um vector 'immuno PBS' com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*,
- ligar as sequências de ADN ou de ADNc obtidas, que codificam os domínios V_{HH} , de modo a que as sequências de ADN ou de ADNc sejam clonadas sequencialmente no vector,

288

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

20. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 10 ou 16 e 17,

susceptível de ser obtida por meio de um processo que compreende os passos seguintes:

- obter uma sequência de ADN ou de ADNc que codifique um domínio V_{HH} ou uma parte sua, que tenha um local de ligação do antígeno com uma especificidade determinada,

- amplificar o ADN ou o ADNc obtido, utilizando um iniciador de 5' que contenha um codão de iniciação e um local *HindIII*, e utilizando um iniciador de 3' que contenha um codão de terminação que possua um local *XhoI*,

- efectuar a recombinação do ADN ou do ADNc amplificado no interior dos locais *HindIII* (posição 2650) e *XhoI* (posição 4067) do plasmídeo pMM984,

- efectuar a transfecção de células permissivas, especialmente células NB-E, com o plasmídeo recombinante,

- controlar a expressão, por exemplo, por meio de um protocolo de EISLE com anticorpos dirigidos contra uma região de um domínio V_{HH} e recuperar os produtos obtidos.

21. Imunoglobulinas de acordo com a reivindicação 20, susceptíveis de serem obtidas por um processo que consiste em efectuar também a clonagem de uma sequência de ADN ou de ADNc que possua outro local determinado de ligação do antígeno, no interior do plasmídeo.

22. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 17 a 21, caracterizada pelo facto de poder ser obtida por um processo em que a célula recombinante transformada é uma levedura, em especial, *S. cerevisiae*.

23. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 17 a 21, caracterizada pelo facto de poder ser obtida por um processo em que o vector é um vector adequado para a expressão em células vegetais e as células recombinantes transformadas são célula vegetais.
24. Imunoglobulina ou fragmento de acordo com uma qualquer das reivindicações 20 ou 21, caracterizada pelo facto de possuir uma actividade catalítica, especialmente pelo facto de ser dirigida contra um antígeno que simula um estado activado de um determinado substrato, tendo tais imunoglobulinas, por exemplo, sido modificadas ao nível do seu local catalítico por mutagénese aleatória ou dirigida.
25. Sequência de nucleótidos caracterizada pelo facto de codificar a totalidade ou uma parte de uma imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, em que tal imunoglobulina compreende uma sequência de péptidos seleccionada entre as seguintes:

VTVSSGTNEVCKCPKCPAPELPGGPSVFVFP

VTVSSEPKIPQPQPKPQPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCPAPPELLGGPSVFIFP

GTNEVCKCPKCP

APELPGGPSVFVFP

EPKIPQPQPKPQPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP

APELLGGPSVFIFP

APELLGGPSVFVFPKPKDVLSISGXPK

APELPGGPSVFVFPKPKDVLSISGRPK

APELPGGPSVFVFPKPKDVLSISGRPK

APELLGGPSVFIFPKPKDVLSISGRPK

GQPREPQVYTLAPXRLEL

GQPREPQVYTLPPSRDEL

GQPREPQVYTLPPSREEM

GQPREPQVYTLPPSQEEM

GGSVQ TGGSLRLSCEISGLTFD
 GGSVQTGGSLRLSCAVSGFSFS
 GGSEQGGGSLRLSCAISGYTYG
 GGSVQPGGSLTLSCTVSGATYS
 GGSVQAGGSLRLSCTGSGFPYS
 GGSVQAGGSLRLSCVAGFGTS
 GGSVQAGGSLRLSCV S F S P S S

WGQGTQVTVSS
 WGQGTLVTVSS
 WGQGAQVTVSS
 WGQGTQVTASS
 RGQGTQVTVSL

e/ou

ALQPGGYCGYGX - - - - - CL
 VSLMDRISQH - - - - - GC
 VPAHLGPGA I L D L K K Y - - - - - KY
 FCYSTAGDGGSGE - - - - - MY
 ELSGGSC E L P L L F - - - - - DY
 DWKYWTCGAQTGGYF - - - - - GQ
 RLTEMGACDARWATLATRTFAYNY
 QKKDRTRWAEPREW - - - - - NN
 GSRFSSPVGSTSRLES - SDY - - NY
 ADPSIYY S I L X I E Y - - - - - KY
 DSPCYMPTMPAPP I R D S F G W - - DD
 TSSFYWYCTTAPY - - - - - NV
 TEIEWYGCNLR T T F - - - - - TR
 NQLAGGWYLDPNYWLSV G A Y - - AI
 RLTEMGACDARWATLATRTFAYNY
 DGWTRKEGG I G L P W S V Q C E D G Y N Y
 DSY P C H L L - - - - - DV
 VEYPIADMCS - - - - - RY

26. Sequência de nucleótidos caracterizada pelo facto de codificar uma imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24 e pelo facto de compreender uma sequência seleccionada entre as representadas na figura 7.

27. Processo para a preparação de um anticorpo monoclonal de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, dirigido contra um determinado antígeno, sendo o local de ligação do antígeno constituído pelas cadeias polipeptídicas pesadas e em que o referido anticorpo é ainda desprovido de cadeias polipeptídicas leves, compreendendo esse processo os passos seguintes:

- imortalizar linfócitos obtidos, por exemplo, a partir do sangue periférico de Camelídeos previamente imunizados com determinado antígeno, com uma célula imortal e de preferência com células de mieloma, para se formar um hibridoma,
- criar em cultura as células imortalizadas (hibridoma) formadas e recuperar as células produtoras de anticorpos que possuam a especificidade desejada.

28. Processo para a preparação de anticorpos dirigidos contra determinados antígenos, o qual compreende os passos seguintes:

- clonar no interior de vectores, especialmente no interior de fagos e mais particularmente bacteriófagos filamentosos, sequências de ADN ou de ADNc obtidas a partir de linfócitos de Camelídeos previamente imunizados com determinados antígenos, capazes de produzirem uma imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24,
- transformar células procarióticas com os vectores supramencionados em condições que permitam a produção dos anticorpos,
- seleccionar o anticorpo adequado, submetendo as células em transformação a uma selecção por afinidade com os antígenos,
- recuperar os anticorpos que possuam a especificidade desejada.

29. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que o vector de clonagem é um plasmídeo ou um vírus eucariótico e a célula transformada é uma célula eucariótica, especialmente uma célula de levedura, uma célula de mamífero, uma célula vegetal ou uma célula de um protozoário.
30. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que o vector de clonagem é um plasmídeo capaz de exprimir a imunoglobulina na membrana bacteriana.
31. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que o vector de clonagem é um plasmídeo capaz de exprimir a imunoglobulina como uma proteína segregada.
32. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo facto de ser dirigida contra um antígeno, tal como um antígeno de uma bactéria, de um vírus ou de um parasita, ou contra uma proteína, um hapteno, um hidrato de carbono ou um ácido nucleico.
33. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo facto de ser dirigida contra uma imunoglobulina idiotípica.
34. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo facto de ser dirigida contra um receptor celular ou uma proteína membranar.
35. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo facto de possuir uma actividade catalítica.

36. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, ou um fragmento de acordo com uma qualquer das reivindicações 11 a 14, caracterizada pelo facto de ser conjugada com uma toxina.
37. Utilização de um fragmento que compreende uma sequência repetida Pro-X em que o símbolo X representa qualquer aminoácido com excepção de Glu, que constitui uma ligação entre moléculas.
38. Utilização de acordo com a reivindicação 37, de um fragmento que compreende uma sequência repetida Pro-X em que o símbolo X representa Gln ou Lis.
39. Utilização de um fragmento de acordo com uma das reivindicações 37 ou 38, em que a sequência repetida Pro-X contém pelo menos 3 repetições de Pro-X e em especial um fragmento constituído por uma repetição de 12 vezes da sequência Pro-X, para acoplar domínios de proteínas ou uma proteína e um ligando.
40. Utilização da região de charneira ou de um fragmento da região de charneira de uma imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24 para acoplar domínios de proteínas ou uma proteína e um ligando.
41. Utilização de um fragmento que compreende a sequência de aminoácidos
EPKIPQPQPKPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP como ligação entre moléculas.

42. Utilização de acordo com a reivindicação 41, de um fragmento que possui a sequência de aminoácidos EPKIPQPPKPPQPPQPPKPPKPEPECTCPKCP, para acoplar domínios de proteínas ou uma proteína ou um péptido e um ligando.
43. Imunoglobulina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo facto de ser um anticorpo heterospecífico.
44. Vector recombinante caracterizado pelo facto de compreender uma sequência de nucleótidos de acordo com uma das reivindicação 25 ou 26 e pelo facto de ser um plasmídeo, um fago, especialmente um bacteriófago, um vírus, um YAC ou um cosmídeo.
45. Célula ou organismo recombinante caracterizados pelo facto de serem modificados por um vector de acordo com a reivindicação 40.
46. Banco de ADNc constituído por sequências de nucleótidos que codificam uma imunoglobulina de cadeias pesadas de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 24, tais como as que podem ser obtidas executando os passos seguintes:
- a) tratar uma amostra que contenha células linfóides, em especial linfócitos periféricos, esplenócitos, nodos linfáticos ou outros tecidos linfóides provenientes de um animal saudável, escolhido especialmente entre os Camelídeos, com a finalidade de separar os linfócitos B,
 - b) separar o ARN poliadenilado de outros ácidos nucleicos e de outros componentes das células,

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

Lisboa, 19 de Setembro de 2001



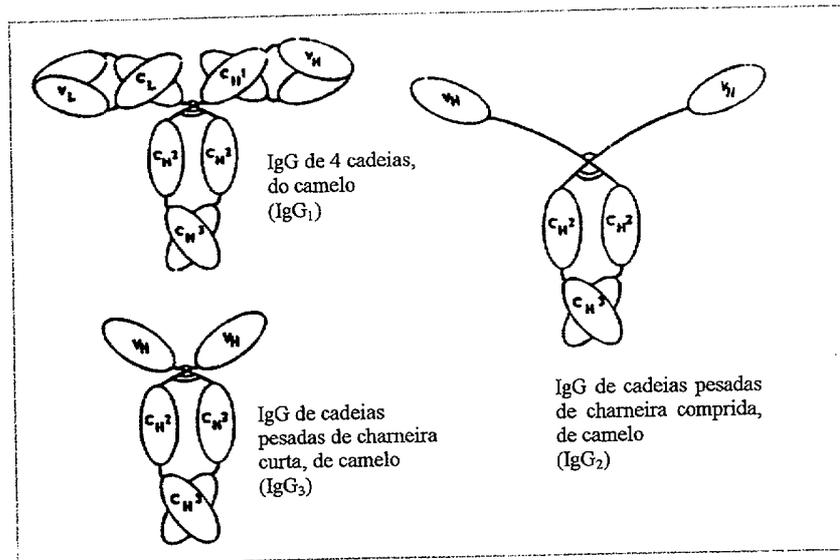
Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, c/c-Drt
1269-063 LISBOA

Resumo

“Imunoglobulinas desprovidas de cadeias leves”



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

A invenção diz respeito a uma imunoglobulina isolada, caracterizada pelo facto de compreender duas cadeias polipeptídicas pesadas suficientes para a formação de um local completo de ligação do antígeno ou vários locais de ligação dos antígenos, sendo ainda esta imunoglobulina desprovida de cadeias polipeptídicas leves.

Lisboa, 19 de Setembro de 2001

Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1269-063 LISBOA

758

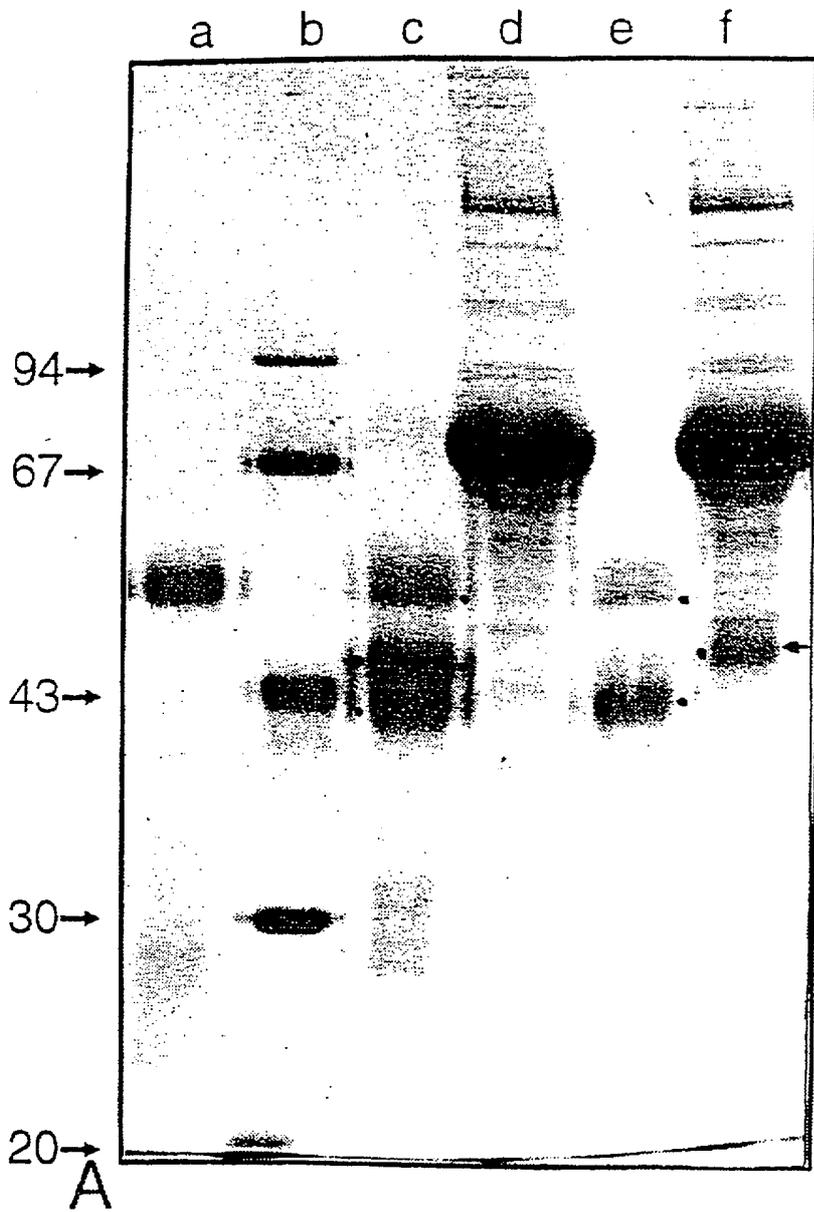


FIG. 1A

258

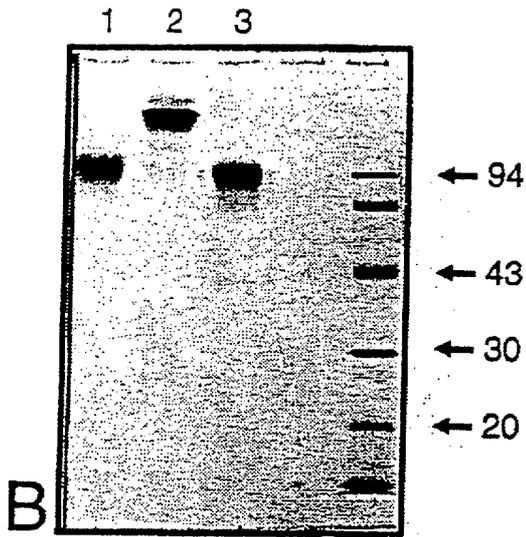


FIG. 1B

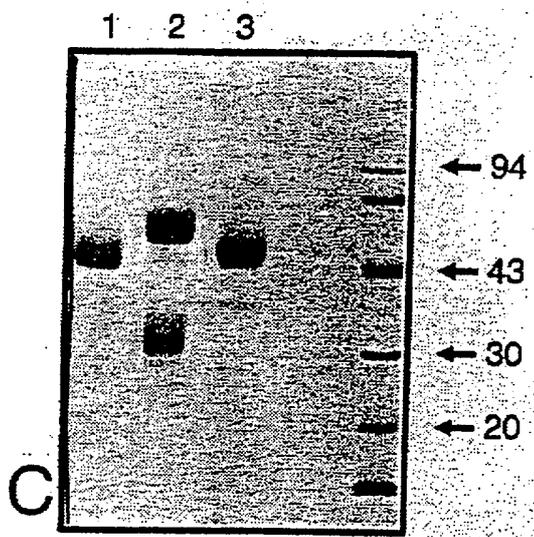
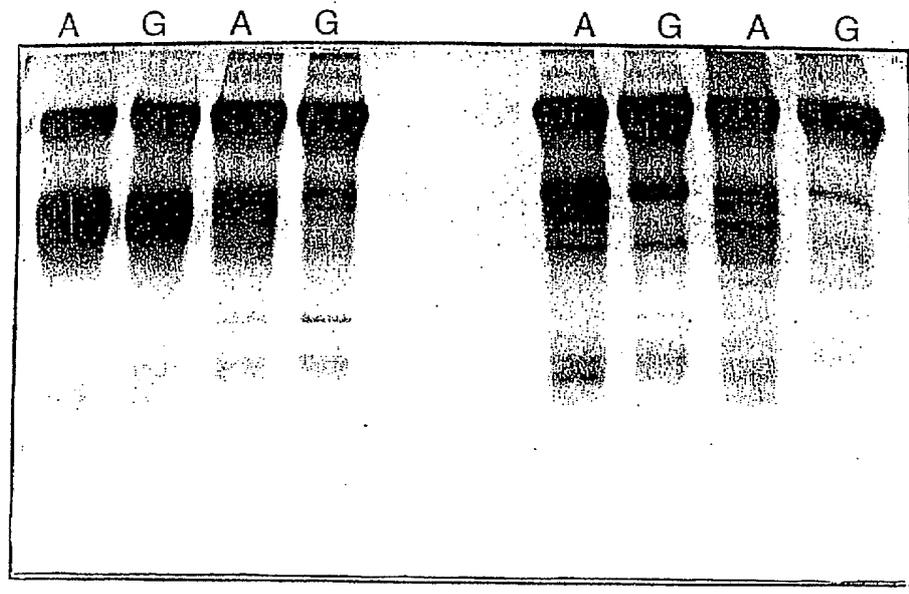


FIG. 1C

288

3/14

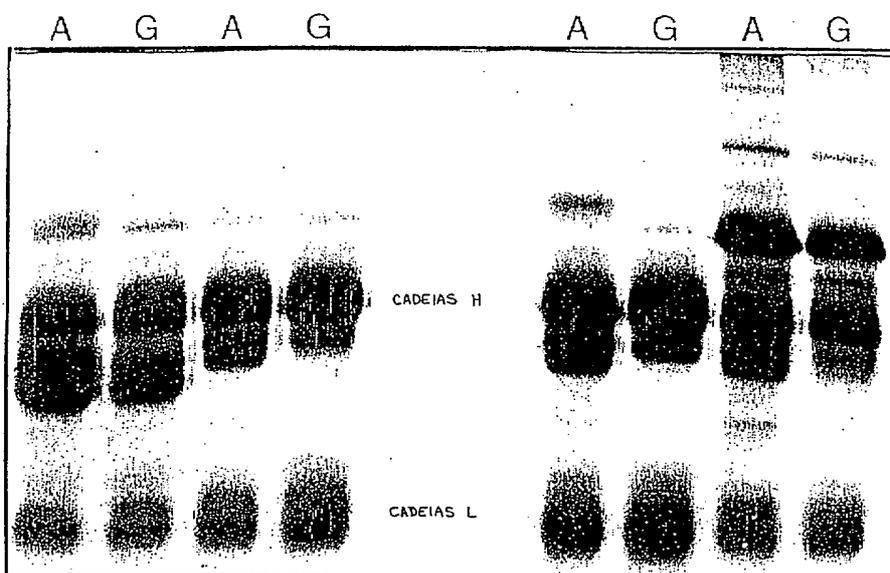


A

FIG. 2A

758

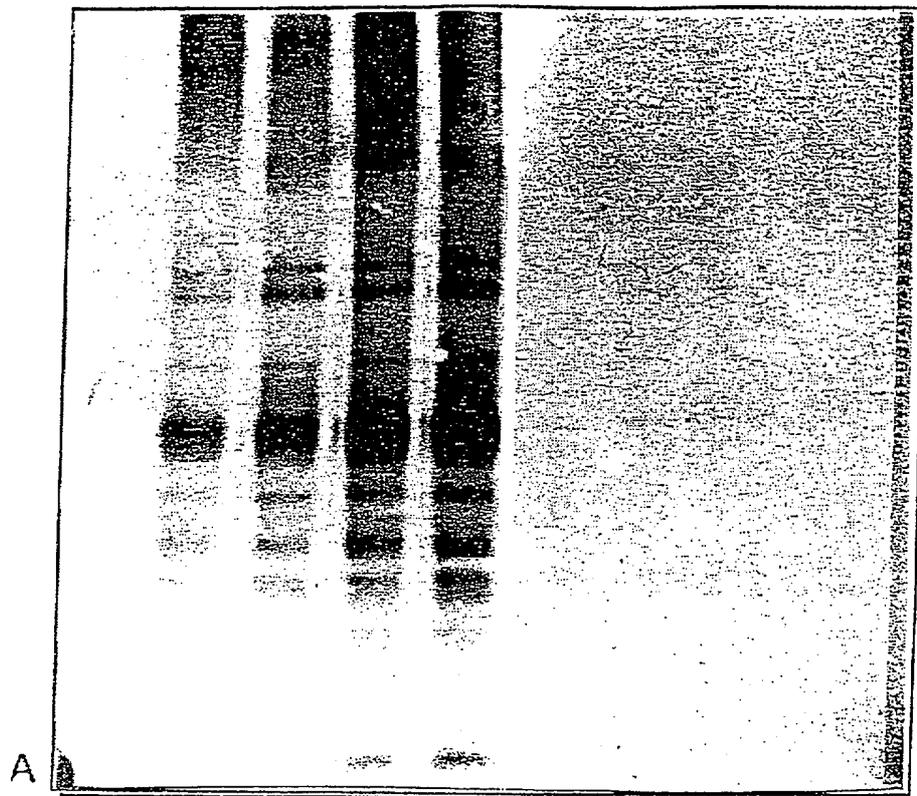
4/14



B

FIG. 28

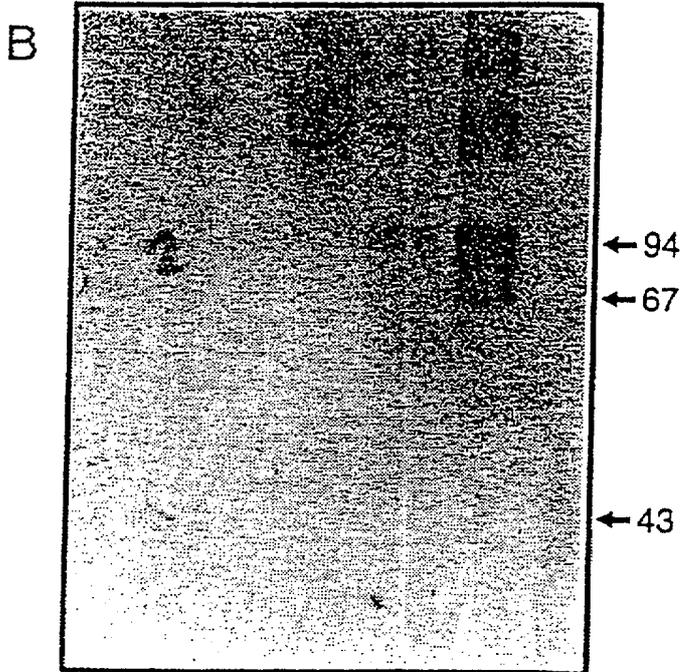
288



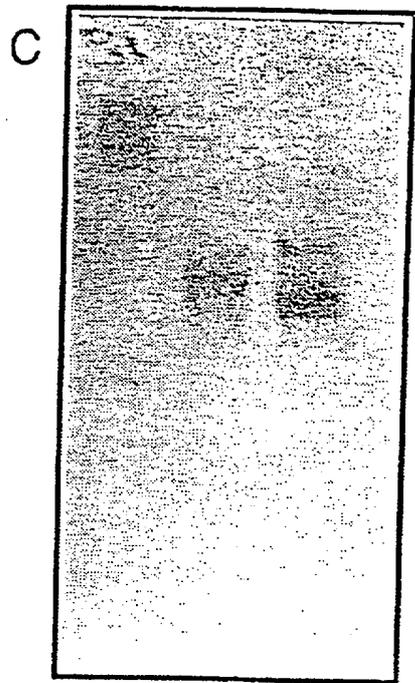
Prot. A	Ig1	Ig2	Ig3	Tot.Ser	Ig1	Ig2	Ig3	SER TOT.
CONTRAPROVA								
	INFECTADAS COM T. EVANSI				SAUDAVEIS			
UNIDADES DE CONTAGEM/5 μL	1258	1214	2700	2978	147	157	160	107

FIG. 3A

788



Ig1 Ig2 Ig3 Ig1 Ig2 Ig3
SAUDÁVEIS INFECTADAS COM T. EVANSI



Ig1 Ig2 Ig3
INFECTADAS COM T. EVANSI
VERMELHO DE PONCEAU

FIG. 3B

FIG. 3C

258

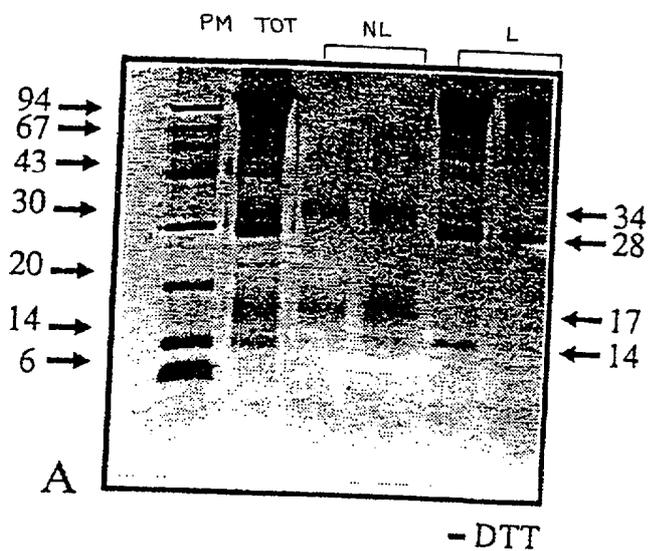


FIG. 4A

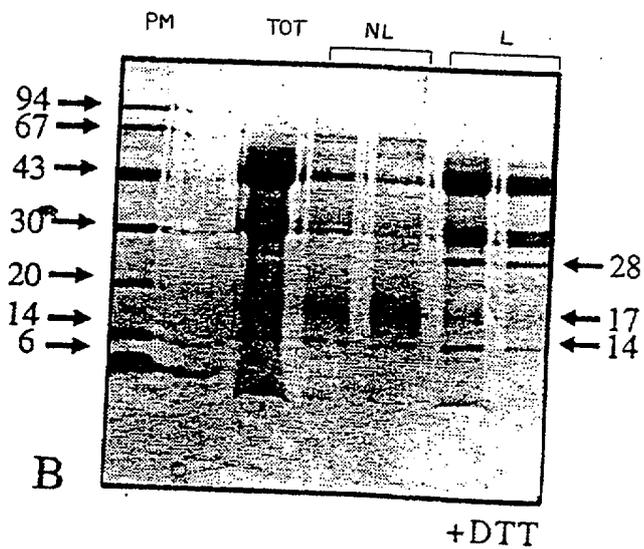


FIG. 4B

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

258

MODELO PARA A I_{gG_3} DO CAMELO

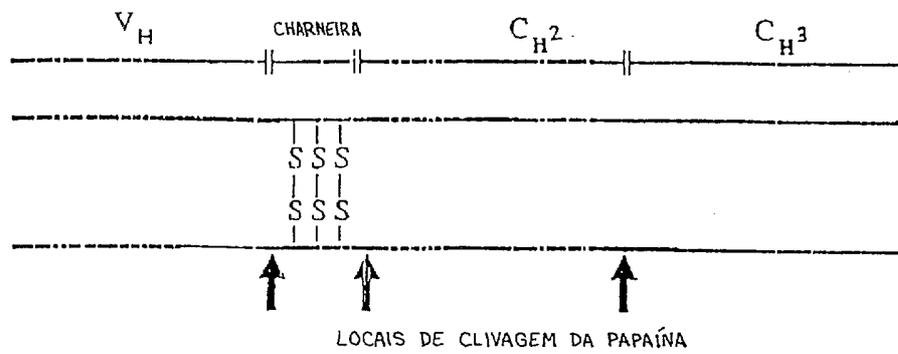


Fig 5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO DE I_{gG_3} DO CAMELO.

258

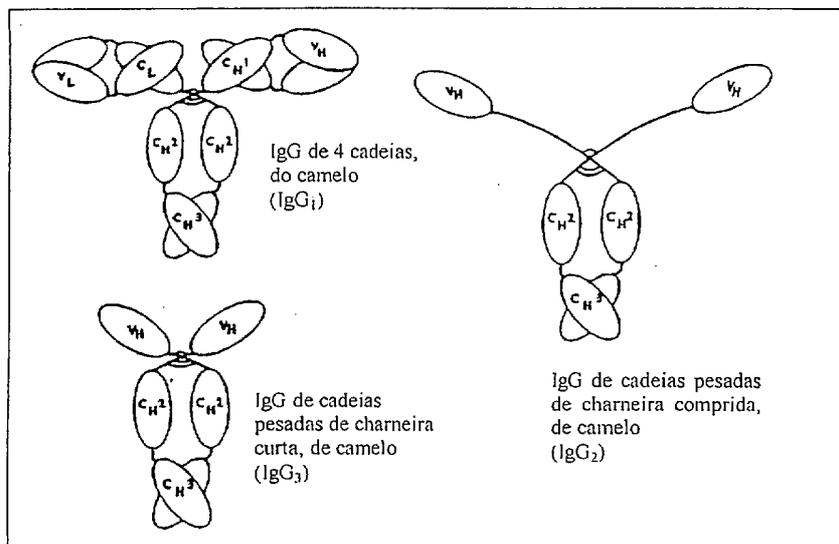


Figura 6: representação esquemática das imunoglobulinas IgG₁ e IgG₂ e IgG₃ putativas. A sequência (Pro-X)₁₂ da molécula IgG putativa pode ser modelada numa repetição 6 an

258

DR01006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR27006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR03006 C-----AGGTGA-----AACTGCTCGAG---TCTGGAGGAGG
 DR11006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR24006 C-----AGGTGA-----AACTGCTCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR16006 C-----TCGAG---TCTGGAGGAGG
 DR19006 C-----TCGAG---TCTGGAGGAGG
 DR07006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR16006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR20006 C-----TCGAG---TCAGGGGGAGG
 DR25005 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR20006 C-----TCGAG---TCTGGAGGAGG
 DR21006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR09006 C-----AGGTGA-----AACTGCTCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR17006 C-----TCGAG---TCTGGGGGAGG
 DR13006 C-----TCGAG---TCAGGGGGAGG
 DR02006 CTCGACTCAGGTGTCCGGTCTGATGTGCAGCTGGTGGCGTCTGGGGGAGG

DR01006 ATCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTC--GTGCG-CAGCCTCTG
 DR27006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCATCTTCTTCTA
 DR03006 CTCGGTGCAGACTGGAGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGT--C-TCTG
 DR11006 GTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAATGT--C-TCTG
 DR24006 GTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAATGT--C-TCTG
 DR16006 CTCGGCGCAGGCTGGAGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC--CCACGG
 DR19006 CTCGGTTCAGGCTGGAGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGC--C-TCTG
 DR07006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAA---TCTCTG
 DR16006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAG---GCTCTG
 DR20006 CTCGGTACAGGTTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAG---CCTCTA
 DR25006 CTCGGTACAAACTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTTGCG---AAATCTCTG
 DR20006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG---TAGCCTCTG
 DR21006 CTCGGTGCAGGTTGGAGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTAAAAT---CTCTG
 DR09006 CTCGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGACACTCTCTTGTTG---TATACAC--
 DR17006 CTCGGTCCAACCTGGAGGATCTCTGACACTCTCCTGTACAGTT---TCTG
 DR13006 CTCGGTGGAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAG---CCTCTG
 DR02006 CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAG---CCTCTG

DR01006 GA--TACAGTAATT---GTCCCCTCACTTG-GAGCTGGTATCGCCAGTTT
 DR27006 AA--TATATGCCTT---GCACCTACGACAT-GACCTGGTACCGCCAGGCT
 DR03006 GA--TTCTCCTTTA---GTACCAGTTGTAT-GGCCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR11006 GC--TCTCCCAGTA---GTACTTATTGCCT-GGGCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR24006 GC--TCTCCCAGTA---GTACTTATTGCCT-GGGCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR16006 GA--TTCCGC-TCA---ATGGTTACTACAT-CGCCTGGTTCCGTCAGGCT
 DR19006 AC--TACACCATCA---CTGATTATTGCAT-GGCCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR07006 GA--TACACGTACG---GTAGCTTCTGTAT-GGGCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR16006 GA--TTCCCCTATA---GTACCTTCTGTCT-GGGGTGGTTCCGCCAGGCT
 DR20006 CT--CACACCGACA---GTAGCACCTGTAT-AGGCTGGTTCCGCCAGGCT
 DR25006 GA--TTGACTTTTG---ATGATTCTGACGT-GGGGTGGTACCGCCAGGCT
 DR20006 GA--TTCAATTTCC---AAACTTCTCGTAT-GGCGTGGTACCGCCAGACT
 DR21006 GAGGTACCCCAGATCGTGTTCCTAAATCTTTGGCCTGGTTCCGCCAGGCT

FIG. 7(1)

DR09006 -----CAACGATACTGGGACCA-----TGGGATGGTTTTCGCCAGGCT
 DR17006 --GGGCCACCTACA---GTGACTACAGTATTGGA-TGGATCCGCCAGGCT
 DR13006 G-----ATACGTAT-CCT----CTATGGCCTGGTTCCGCCAGGTT
 DR02006 GAGA----CAGTTTCAGTAGATT--TGCCATGTCTTGGTTCCGCCAGGCT

DR01006 CCAGGAACGGAGCGCGAGTTCGTCTCCAGTATGGATCCGGATGGAAATAC
 DR27006 CCAGGCAAGGAGCGCGAATTTGTCTCAAGTATAAATATTGATGGTAAGAC
 DR03006 TCAGGAAAGCAGCGTGAGGGGGTTCGACGCCATTAATAGTGGCGGTGGTAG
 DR11006 CCAGGGAGGGAGCGTGAGGGGGTTCACAGCGATTAA-----CACTGATGG
 DR24006 CCAGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTTCACAGCGATTAA-----CACTGATGG
 DR16006 CCTGGGAAGGGGCGTGAGGGGGTTCGCAACAATTAATGGTGGTTCG-----
 DR19006 CCAGGGAAGGAGCGTGAATTGGTTCGACCGATTCAAGTTGTCCGTAGTGA
 DR07006 CCAGGCAAGGAACGTGAGGGGGTTCGCAACTATTCTTAATGGTGGTACTAA
 DR16006 CCAGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTTCGCGGGTATTAAATAGTGCAGGAGGTAA
 DR20006 CCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGCAAGTATATATTTGGTGTAGTGGTGG
 DR25006 CCAGGGGATCAGTGCAAATTTGGTCTCAGGTATTCTGAGTGTGGTACT-C
 DR20006 CCAGGAAATGTGTGTGAGTTGGTCTCAAGTATTTACAGTGTGG-----
 DR21006 CCAGAGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGCGAGTCTTTTCGACTAAGGATGGTAA
 DR09006 CCAGGGAAGAGTGCGAAGGGTTCGCGCATATTACGCCTGATGGTATGA-
 DR17006 CCAGGGAAGGACCGTGAAGTAGTTCGACCCGCTAATACTGGTG-----
 DR13006 CCAGGGCAGGAGCGCGAGGGGGTTCGCGTTTGTTCAAACGG-----
 DR02006 CCAGGGAAGGAGTGCGAATTTGGTCTCAAGCATTCAAAGTAATGGAAGGAC

DR01006 CAAGTACA-----CATACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACC
 DR27006 AACATACG-----CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR03006 GACATACTA-CAACACATATGTCGCCGAGTCCGTGAAGGGCCGATTTCGCC
 DR11006 CAGTATCAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR24006 CAGTGTAT-ATACGCA-----GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR16006 -----CGA-CGTACATACTACGCCGACTCCGTGACGGGCCGATTTCACC
 DR19006 TACT--CGC-C-TCACAGACTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGATTTCACC
 DR07006 -----CACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR16006 -----TACTTACTATGCCGACCGCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR20006 -----TACGAATTATCGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR25006 CATATACAAAGAGTGGAGACTATGCTGAGTCTGTGAGGGGCCGGTTACC
 DR20006 CA-AAACATACTACGTCGACC--GCA-----TGAAGGGCCGATTTCACC
 DR21006 GA-----CATTCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR09006 -----CCTTCATTGATGAACCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR17006 -----CGACTAGTAAATTTCTACGTCGACTTTGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR13006 --CTGACAAT-AGTGCATTATATGGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACC
 DR02006 AACTGA-----GGCCGATTCCGTGCAAGGGCCGATTTCACC

DR01006 ATGTCCCGAGGCAGCACCGAGTACACAGTATTTCTGCAAATGGACAATCT
 DR27006 ATCTCCCAAGACAGCGCCAAGAACACCGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCT
 DR03006 ATCTCCCAAGACAACGCCAAGACCACGGTATATCTTGATATGAACAACCT
 DR11006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGGAAACGGTACATCTCCAGATGAACAACCT
 DR24006 ATCTCCCAAGACACCGCCAAGAAAACGGTATATCTCCAGATGAACAACCT
 DR16006 ATCTCCCGAGACAGCCCCAAGAATACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCT
 DR19006 ATCTCCCAAGGCAACACCAAGAACACAGTGAATCTGCAAATGAACAGCCT
 DR07006 ATCTCCCAAGACAGCACGTTGAAGACGATGTATCTGCTAATGAACAACCT
 DR16006 ATCTCCCAAGGGAATGCCAAGAATACGGTGTCTCTGCAAATGGATAACTT
 DR20006 ATCTCCCAACTCAACGCCCAAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
 DR25006 ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
 DR20006 ATTTCTAGAGAGAATGCCAAGAATACATTGTATCTTACAACCTGAGCGGCCT
 DR21006 ATCTTCTTAGATAATGACAAGACCCTTTCTCCTTACAACCTGATCGACT
 DR09006 ATCTCCCGAGACAACGCCCAGAAAACGTTGTCTTTGCGAATGAATAGTCT

FIG. 7(2)

258

DR17006 ATTTCCCAAGACAACGCCAAGAATACGGTATATCTGCAAATGAGCTTCCT
 DR13006 ATCTCCACGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGCGCAACCT
 DR02006 ATCTCCCGAGACAATTCCAGGAACACAGTGTATCTGCAAATGGAACAGCCT

DR01006 GAAACCTGAGGACACGGCGATGTATTACTGTAAAAC-A---GCCCTAC--
 DR27006 GAAACCTGAGGACACGGCGATGTATTACTGTAAAAT-A---GA---TTC--
 DR03006 AACCCCTGAAGACACGGCTACGTATTACTGTGCGGGCGG---TCCCAGCCC
 DR11006 GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACTGCGCGGCAA---GACTGACGG
 DR24006 GCAACCTGAGGATACGGCCACCTATTACTGCGCGGCAA---GACTGACGG
 DR16006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTACTTCTGTGCAGCAG---G-----CTC
 DR19006 GACACCTGAGGACACGGCCATCTACAGTTGTGCGGCAA---C-----CAG
 DR07006 GAAACCTGAAGACACGGGCACCTATTACTGTGCTG-CA---GAACTAAGT
 DR16006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGCGCGG-CG---GATAGTCCA
 DR20006 GAAACCTGAGGACACGGCCATGTACTACTGTGCAATCA---CTGAAATTG
 DR25006 GAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGCGCGGTAGATGGTTGGACCC
 DR20006 CAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCG-----CC
 DR21006 GAACCCGGAGGACACTGCCGACTACTACTGCGCTGCAAATCAATTAGC--
 DR09006 GAGGCCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCAGATTG-----
 DR17006 GAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGTGCGGCAG-----CGGACCC
 DR13006 GCAACCTGACGACACTGGCGTGTACTACTGTGCGGCC-----CAA
 DR02006 GAAACCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGGGCAGT-----

DR01006 -----A-AC--CTGGGGGTTATTGTGGGTA-
 DR27006 -----GTAC--CCGTGCCATCTCCTTGATG-
 DR03006 ACTTGGGACCT-----GGCG-CCATT-----CTTGATTTG
 DR11006 AGATGGGGGCTTGTGATGCGAGATGGGGCGACCTTAGC--GACAAGGAC-G
 DR24006 AGATGGGGGCTTGTGATGCGAGATGGGGCGACCTTAGC--GACAAGGAC-G
 DR16006 GCGTTTTT-CTAGTCCTGTTGGGAGCACTTC-TAGAC---TCGAAAGTAG
 DR19006 TAGTTTTTACTGGTACT-----GCAC-----C---ACG-----G
 DR07006 GGTGGTAGTTGTGAATTGC---CTTTGC-----TATTTGACTA-----
 DR16006 TGTTACATGCCGACTATGC---CCGCTCCCCGATACGAGACAGTTTTGG
 DR20006 AGTGGTATGGGTGCAATTT---AAGGACTACTTTTACT---C-----G
 DR25006 GGAAGGAAG--GGGGAATCGGGTTAC----CCTGGTCGGTCCAATGTGAA
 DR20006 GTTTGA-----TATC----CTATTGCAGAC--ATGTGTT
 DR21006 ---TGTTGGCTGGTATT-----TGGACCCGAATTACTGG-CTCTCTGTG
 DR09006 ---GAAATACTGGA----CTTGTGGTGC--CCAGA-CTGG-----AG
 DR17006 AAGTATATATTATAGTATC-----CTCCNNAT-----
 DR13006 AAGAAGGATCGTA----CTAGATGGGC-----CGAGCCT-----
 DR02006 -----CTCCCTAA--TGGACCGAATTTCT

DR01006 --TGGGTANTGCCTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR27006 --T-----CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR03006 AAAAAGTATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR11006 TTTGCGTATAACTACTGGGGCCGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR24006 TTTGCGTATAACTACTGGGGCCGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR16006 CGA-CT-ATAACTATTGGGGCCAGGGGATCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR19006 CGC-CTTATAACGTCTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR07006 CTGGG-----GCCAGGGCACCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR16006 CTGGGATGATTTT-----GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR20006 CTGGG-----GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR25006 GATGGTTATAACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
 DR20006 CGAGAT----ACG---GCGACCCGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
 DR21006 GGTGCATATGCCATCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAC-
 DR09006 GATACTTCGGACAG-TGGGGTCAGGGGGCCAGGTCACCGTCTCCTCACT
 DR17006 --TGAGTATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA--

FIG. 7(3)

258

```

DR13006 CGAGAATGGAACAAC TGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA--
DR02006 CCAACATGGG--TGCCGGGGCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCCT----

DR01006 AG----TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR27006 AG----TTACCCGTACGAGCTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR03006 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR11006 AG----TTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR24006 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR16006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR19006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR07006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR16006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR20006 ----AGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR25006 ---TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR20006 ---TAGTTACCCGTACGACGAACCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR21006 ---TAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR09006 AGCTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTTAATAGAATTC
DR17006 -----
DR13006 -----
DR02006 -----
-----TA
    
```

FIG. 7(4)

288

14/14

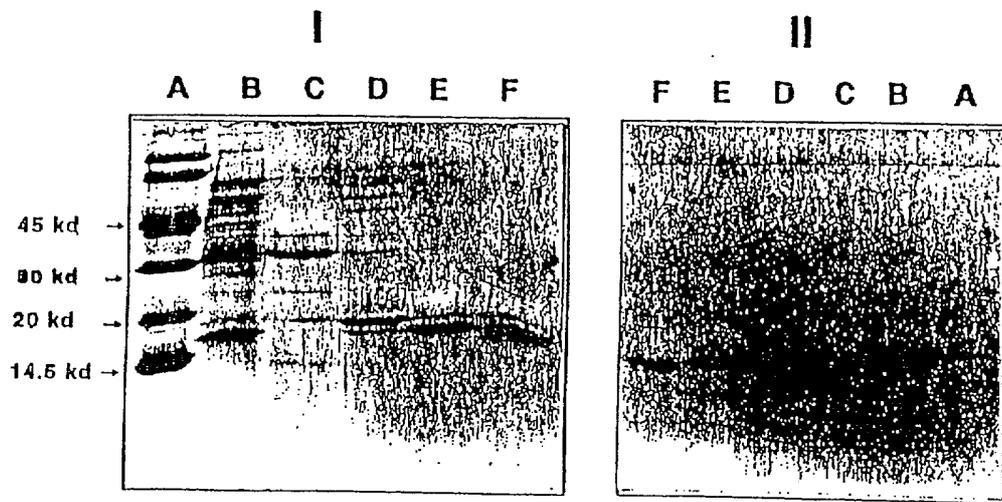


FIG. 8