



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 444**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C07K 16/06** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04008412 .1**

96 Fecha de presentación : **28.01.1991**

97 Número de publicación de la solicitud: **1566442**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54 Título: **Obtención y empleo de genotecas de anticuerpos humanos ("bancos de anticuerpos humanos").**

30 Prioridad: **01.02.1990 DE 4002898**  
**09.02.1990 DE 4003881**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.04.2010**

73 Titular/es: **SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS**  
**PRODUCTS GmbH**  
**Gorzhauser Hof**  
**Emil-von-Behring-Strasse 76**  
**35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es: **Little, Melvyn;**  
**Breitling, Frank;**  
**Seehaus, Thomas;**  
**Dubel, Stefan y**  
**Klewinghaus, Iris**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

## DESCRIPCIÓN

Obtención y empleo de genotecas de anticuerpos humanos (“bancos de anticuerpos humanos”).

5 La invención se refiere a la obtención y al empleo de genotecas de anticuerpos humanos (AK). A partir de una mezcla de linfocitos B humanos se traduce su ARNm en ADNc mediante el empleo de oligo-dT-cebadores. A continuación tiene lugar una amplificación de los ADNc específicos de los AK mediante una reacción en cadena de polimerasa (RCP, Polymerase Chain Reaction) con utilización de secuencias cebadoras de oligonucleótidos adecuadas. Por medio de la expresión de estos ADNc amplificados, específicos de los AK, en un vector de expresión bacteriano, por ejemplo en  
10 un vector pFMT, que se describe a continuación, en *E. coli*, está disponible, por lo tanto, una biblioteca de anticuerpos humanos con un amplio repertorio para llevar a cabo la exploración (“screenen”) con antígenos seleccionados *in vitro*.

15 Se estima que el sistema inmune de los seres humanos, o bien de los mamíferos, tiene entre  $10^6$  y  $10^8$  anticuerpos diferentes. Este número de anticuerpos es suficiente para generar una reacción inmune del cuerpo tanto contra todos los antígenos que existen en la naturaleza así como, también, contra los antígenos sintéticos. Si se tiene en consideración así mismo que con frecuencia varios anticuerpos reaccionan con el mismo antígeno, se establece el repertorio de los anticuerpos realmente diferentes más bien en el intervalo comprendido entre  $10^6$  y  $10^7$ .

20 Hasta el presente han sido obtenidos los anticuerpos específicos siempre a partir de una inmunización con el antígeno correspondiente, por ejemplo por medio de una inyección del antígeno en el organismo o por medio de una incubación de células del bazo *in vitro* con estos antígenos. En el caso de los anticuerpos policlonales pueden aislarse a continuación las inmunoglobulinas a partir del suero y a partir de las mismas pueden obtenerse los anticuerpos específicos por ejemplo por medio de procedimientos de absorción. Los anticuerpos monoclonales son aislados a partir  
25 de los sobrenadantes celulares o bien a partir del lisado celular de las células tumorales del bazo (células de hibridoma) clonadas, fusionadas con linfocitos B individuales. Los procedimientos que han sido citados precedentemente no son adecuados, de manera especial, para la obtención de anticuerpos humanos específicos o bien de anticuerpos monoclonales humanos.

30 La presente invención se plantea por consiguiente la tarea de desarrollar un método accesible en general para la generación de anticuerpos monoclonales humanos específicos (huMAK's) o de fragmentos de anticuerpos, que contengan los puntos de enlace con el antígeno.

35 Se ha encontrado que los huMAK's buscados o sus fragmentos, que contienen los dominios variables, que se enlazan con los antígenos, pueden ser aislados a partir de genotecas de inmunoglobulina humana. En primer lugar se partió de una mezcla de linfocitos B humanos no activados cuyo ARNm es aislado y es traducido en ADNc con ayuda de oligo-dT-cebadores. Una amplificación específica de la población de anticuerpos ADNc dentro del conjunto de ADNc obtenido se consiguió por medio de la utilización de la RCP. Con esta finalidad se emplearon determinados oligonucleótido-“cebadores”, que son homólogos con respecto a las secuencias conservadas sobre ambos extremos  
40 del anticuerpo-ADNc (véase más adelante y los ejemplos). La maqueta del cebador para la reacción inversa para la síntesis de la hebra no codificante del ADN de la cadena pesada está basada en secuencias IgM (subclase III, puesto que ésta abarca la mayoría de las secuencias IgM). Las moléculas IgM están presentes en los linfocitos B no activados con mayor frecuencia que todas las otras clases de inmunoglobulinas. Las secuencias de IgG son preponderantes, por el contrario, en los linfocitos B activados, cuyo repertorio de anticuerpos diferentes es mucho menor. En el caso de  
45 una biblioteca IgG existiría por otra parte el peligro de que dominase en la biblioteca un IgG expresado de forma especialmente intensa o un número reducido de los mismos.

Se llevaron a cabo, de manera conveniente, hasta 30 episodios de amplificación. Los oligonucleótidos-“cebadores” contienen puntos de restricción adecuados con objeto de insertar el ADN amplificado por ejemplo en el plásmido de expresión del anticuerpo pFMT (véase más adelante). Este plásmido de expresión posibilita la expresión de anticuerpos-ADNc y a continuación la secreción de los productos de expresión en bacterias (*E. coli*). El anticuerpo-operón del plásmido contiene las secuencias de los fragmentos variables tanto de las cadenas pesadas así como, también, de las cadenas ligeras de un anticuerpo. Las secuencias “conductoras” adecuadas procedentes del fragmento aminoterminal de una proteína bacteriana posibilitan la secreción de los fragmentos de anticuerpo. Las secuencias “conductoras” son  
55 escindidas durante la secreción por un enzima bacteriano. Durante la secreción de los productos anticuerpos-ADNc se asocian las cadenas ligeras y las cadenas pesadas del anticuerpo (con o sin dominios constantes limítrofes). De este modo, se forma un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que contiene un punto funcional de enlace con el antígeno. De la misma manera, han sido descritos por otros autores constructos similares para anticuerpos individuales (Better *et al.* (1988), Science 240, 1041, y Skerras & Plückthun (1988), Science 240,1038).

60 La amplificación del ADN, que codifica fragmentos variables de anticuerpos, ha sido descrita ciertamente por otros autores (Orlandi *et al.* (1989), Proc. Nati. Acad. Sci. 86, 3833; Sastry *et al.*, (1989) Proc. Nati. Acad. Sci. 86, 5728; Ward *et al.* (1989), Nature 341, 544); Huse *et al.* (1989), Science 246, 275). Sin embargo se aisló en este caso el ARNm, que codifica entre otras cosas también anticuerpos, a partir de células de hibridoma o de linfocitos del bazo  
65 después del tratamiento con un antígeno determinado. Por consiguiente se emplearán en aquél caso también secuencias cebadoras que únicamente están basadas en secuencias IgG. Naturalmente en aquél caso es ventajoso para buscar el mayor número posible de clones de anticuerpo-ADN, que procedan de linfocitos activados. Con cebadores procedentes de secuencias IgG son mucho mayores las probabilidades de encontrar clones, que contengan ADN codificadores de

anticuerpos contra el antígeno inyectado. Así mismo debe añadirse que en los trabajos existentes han sido sintetizados anticuerpos-ADN murinos y, por consiguiente no humanos y que han sido amplificados además con exclusión de las regiones de la cadena lambda.

En la presente invención son utilizadas, por el contrario, secuencias cebadoras que son homologas con respecto a las secuencias de los dominios constantes del IgM-ADNc. De este modo la invención puede ser realizada del mejor modo posible, es decir que puede ponerse a disposición una gran variedad de anticuerpos, concretamente todo el repertorio de anticuerpos, en forma de una biblioteca. La expresión preferentemente en *E. coli* proporciona entonces la biblioteca de anticuerpos humanos buscada, en la que se encuentran los anticuerpos humanos buscados o bien los fragmentos de los anticuerpos mediante exploración de los clones bacterianos con el antígeno elegido.

En la tabla 1 se han reunido oligonucleótidos cebadores adecuados para llevar a cabo la amplificación. Las posiciones de los cebadores, precedentemente citados, sobre las cadenas  $\mu$ , kappa y lambda se han representado esquemáticamente en la tabla 2. En los ejemplos siguientes se han descrito las construcciones biológicas moleculares en detalle, entre las cuales también se encuentra el vector de expresión, es decir el plásmido de expresión del anticuerpo pFMT. La invención se refiere, por consiguiente, a bibliotecas de anticuerpos humanos preparadas mediante transcripción del ARNm a partir de linfáticos B humanos no activados (periféricos) por medio de oligo-dT-cebadores, seguido de una amplificación por medio de una RCP con utilización de secuencias, que contienen cebadores, homologas con respecto a las regiones conservadas de IgM-ADNc y a continuación incorporación en un plásmido de expresión adecuado para llevar a cabo la expresión en microorganismos, preferentemente en el vector de expresión pFMT para llevar a cabo la expresión en *E. coli*. En una forma preferente de realización se incorpora, además, una secuencia, que codifica un péptido marcador, por ejemplo una secuencia "TAG" de tal manera que los productos de la expresión pueden ser detectados de manera sencilla con anticuerpos monoclonales establecidos frente al péptido marcador (Wehland *et al.*, (1984), EMBO J. 3,1295).

De igual modo, la invención abarca el empleo de las bibliotecas de anticuerpos humanos precedentes para llevar a cabo el aislamiento de los anticuerpos humanos buscados o bien de fragmentos de anticuerpos con puntos funcionales para el enlace de antígenos mediante exploración "screenen" con antígenos seleccionados y así mismo abarca procedimientos para llevar a cabo el aislamiento de los anticuerpos humanos citados o sus fragmentos que se enlazan con los antígenos así como también abarca procedimientos para la obtención de las citadas bibliotecas de anticuerpos humanos.

La invención abarca, así mismo, vectores de expresión con las propiedades del plásmido de expresión del anticuerpo pFMT.

Los ejemplos siguientes desarrollan adicionalmente la invención sin limitarla. Por último la invención está contenida en las reivindicaciones.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Obtención de un vector de expresión de anticuerpos*

Se eligió el plásmido pKK233-2 (Amann und Brosius, (1985) Gene 40, 183 y Straus und Gilbert, (1985) Proc. Nati. Acad. Sci. 82, 1014) como vector básico para la formación del vector de expresión de anticuerpos (figura 1).

Como paso previo a la incorporación del anticuerpo-operón se cortó el plásmido con Sall y BamHI, se rellenaron los extremos con polimerasa Klenow y se ligaron. De este modo se eliminaron estos dos puntos de restricción y el ADN situado entremedias. Por otra parte se segmentó el plásmido con HindIII, se rellenaron los extremos con la polimerasa Klenow y se ligó con enlazadores BamHI. Por medio de esta operación se eliminó el punto de restricción HindIII y se insertó un punto BamHI. En este plásmido modificado se insertó el anticuerpo ADN. En la figura 3 se muestra una vía de construcción esquemática del anticuerpo-operón que codifica un anticuerpo ARNm bicistrónico. Con objeto de posibilitar la secreción del anticuerpo se utilizó la secuencia "conductora" del enzima bacteriano pectatliasa. La secuencia "conductora" de este enzima ha sido ya empleada para la expresión y para la secreción de un anticuerpo ratón-humano quimérico (Fab-Fragment, Better *et al.*, en el lugar indicado) así como el fragmento variable de un anticuerpo "humanizado" (Ward *et al.*, en el lugar indicado; Huse *et al.*, en el lugar indicado). Se sintetizaron a partir de varios oligonucleótidos (tabla 4) el ADN para la primera secuencia "conductora" (P<sub>1</sub> por delante de la cadena pesada) y la secuencia para un segundo punto de enlace de ribosomas (RBS) y una segunda secuencia "conductora" (P<sub>2</sub> por delante de la cadena ligera).

Han sido obtenidos por Dr. G. Winter (Cambridge, UK) anticuerpos ADNc, que codifican las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo humano (HuVhlys o bien HuVllys; Riechmann *et al.*, (1988) J. Mol. Biol. 203, 825). Se insertaron los puntos de restricción HindIII (HuVhlys) y EcoRV (HuVllys) con objeto de posibilitar la inserción del anticuerpo ADNc en el vector de expresión. Se introdujeron otros puntos de restricción para Bañil (HuVhlys) y BstEII y respectivamente KpnI (HuVllys), con objeto de intercambiar "en bloque" regiones hipervariables. En el extremo de la secuencia HuVhlys-ADNc se incorporó una señal de detención. Se eliminó en la

cadena ligera un punto BanII. Estas modificaciones se llevaron a cabo por medio de una mutagénesis dirigida al punto “site directed mutagenesis” en el bacteriófago M13mpl8 (Zoller y Smith, Meth. Enzymol. 100, 468-500). En la tabla 5 se ha mostrado la secuencia del anticuerpo ADN confeccionado.

Para la inserción de la secuencia “conductora”  $P_1$  (tabla 4) se sometió a digestión al plásmido modificado pKK233-2 con los enzimas de restricción NcoI y PstI y se insertó  $P_1$  entre estos puntos (pKK233-2- $P_1$ ). Se llevaron a cabo otras etapas de clonación hasta la última etapa con el plásmido pUC18. El motivo se debe a que la presencia de fragmentos individuales del anticuerpo-operón en el vector de expresión influye negativamente sobre el crecimiento del anfitrión bacteriano.

Como paso previo a la clonación en pUC18 tuvo que ser eliminado su punto de restricción BamHI. Tras una digestión con BamHI se rellenaron los extremos de las cadenas individuales con el fragmento de Klenow y se volvieron a unir. Este plásmido modificado se sometió a digestión a continuación con PstI y HindIII y se ligó con  $P_2$  más RBS entre estos puntos de restricción (pUC18- $P_2$ ). Por medio de esta operación desaparece el punto de restricción original HindIII del plásmido y se incorpora un nuevo punto de restricción HindIII. A continuación se sometió a digestión al pUC18- $p_2$  con PstI y con HindIII y se ligó el ADN de la cadena pesada (inserto de PstI-HindIII procedente de M13) en estos dos puntos (pUC18-HP<sub>2</sub>). Este plásmido se sometió a digestión a continuación con EcoRV y con BamHI y se aportó por ligadura el ADN de la cadena ligera (inserto de EcoRV-BamHI procedente de M13) (pUC18-HP<sub>2</sub>L).

En una forma preferente de realización se aportó por ligadura (tabla 4) una secuencia “TAG” en el nuevo punto de corte HindIII. La secuencia “TAG” codifica el péptido Glu-Glu-Gly-Glu-Glu-Phe y es reconocido por el anticuerpo monoclonal YL 1/2 (Wehland *et al.* (1984) EMBO J. 3, 1295). El plásmido resultante es pUC-HTP<sub>2</sub>L.

Para la inserción de HP<sub>2</sub>L o bien de HTP<sub>2</sub>L en el vector de expresión se cortaron pUC18-HP<sub>2</sub>L o bien PUC-HTP<sub>2</sub>L con PstI y BamHI y el correspondiente fragmento de restricción se ligó respectivamente en el plásmido modificado pKK233-2- $P_1$  en estos dos puntos de restricción. En la tabla 6 se muestra una representación esquemática del vector de expresión pFMT confeccionado.

## Ejemplo 2

### *Obtención de ARN a partir de linfocitos B humanos*

Con objeto de enriquecer las células B periféricas a partir de sangre humana, ésta se diluyó con fosfato tamponado salino PBS (“phosphate buffered saline”) 1:1 y se centrifugó sobre una almohadilla de Ficoll<sup>®</sup> (Pharmacia) (1,077 kg/l). Las células de la interfase se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en medio RPMI, que contenía un 10% de suero de ternera fetal, con un fondo de plástico (botella de cultivo) durante una hora a 37°C. Las células adherentes (monocitos y macrófagos) se adhirieron sobre el recipiente de cultivo y de este modo pudieron ser separadas de la preparación. Las células no adherentes se reunieron por medio de una centrifugación y se homogeneizaron con isotiocianato de guanidinio 4,4 M, mercaptoetanol al 5% y lauroilsarcosina al 2%. El homogenato se centrifugó a continuación sobre una almohadilla de CsCl 5,7 M durante 18 horas a 125.000 g. El ARN sedimentado se disolvió en H<sub>2</sub>O bidestilada y se precipitó durante la noche con etanol al 70% y con 1/20 en volumen de LiCl 8 M a -20°C.

Con objeto de obtener una pluralidad todavía mayor de anticuerpos de diversa especificidad se mezclaron preparaciones de ARN de respectivamente 500 ml de sangre de 20 personas diferentes.

## Ejemplo 3

### *Amplificación del anticuerpo ADN*

Se purificó el ARNm a través de oligo-dT-sefarosa (estuche de la firma Phärmacia) y se tradujo en ADNc con transcriptasa inversa (estuche de la firma Amersham) y con oligo-dT-cebador. Los productos se emplearon directamente en la reacción en cadena de polimerasa “polymerase chain reaction” (RCP). En las tablas 1 y respectivamente 2 se han mostrado el cebador para la RCP y los puntos de hibridación. Por medio de una combinación de los  $\mu$ -ADN obtenidos bien con ADN kappa o con ADN lambda en el vector pFMT se prepararon dos bancos diferentes de expresión. El empleo de diversos cebadores para la síntesis de las hebras no codificantes en la reacción en cadena de polimerasa “polymerase chain reaction” posibilita la obtención de dos tipos diversos de anticuerpos, que en uno de los casos únicamente contienen los dominios variables, conteniendo en el otro caso adicionalmente además un dominio constante (similar al fragmento Fab de un anticuerpo). Para la RCP se hicieron reaccionar 4  $\mu$ l de un ADNc de síntesis respectivamente con 0,2 nmol de los dos cebadores en un volumen de 50  $\mu$ l. La carga de la reacción contenía 100 mM de KC1, un 0,1% de gelatina y 2,5 U de polimerasa Taq. Al cabo de 30 ciclos de polimerización, constituidos por 1 minuto a 95°C, 2 minutos a 55°C y 2 minutos a 72°C, se precipitó con etanol el ADN.

Ejemplo 4

*Inserción del anticuerpo ADN en el plásmido de expresión*

- 5 El ADN precipitado se recogió en el tampón de carga para geles de agarosa (0,1% de azul de bromofenol, 7% de Ficoll<sup>R</sup> [Pharmacia]) y se separó sobre un 2% de agarosa a 10 V/cm en tampón TBE (45 mM de tris-borato, pH 8,0, 10 mM de EDTA). El anticuerpo ADN sintetizado se identificó por medio de su peso molecular y se eluyó a partir del gel. Después de la precipitación con etanol se recogió dicho anticuerpo ADN en tampón para el correspondiente enzima de restricción y se cortó con el correspondiente enzima de restricción (Boehringer Mannheim) (véanse las tablas 1 y 2).  
10 Después de una precipitación en etanol se ligó en el vector pFMT cortado de la misma manera, como se ha mostrado esquemáticamente en la tabla 7.

Ejemplo 5

- 15 *Expresión y exploración “screenen” de anticuerpos en E. coli*

Se transfirieron *E. coli* competentes con plásmidos pFMT, que contienen la biblioteca de anticuerpo-ADN insertada, se extendieron sobre placas de agarosa y a continuación se incubaron con filtros de nitrocelulosa, que estaban recubiertos con el antígeno buscado. Después de la eliminación de los anticuerpos enlazados de manera inespecífica, se identifican los clones activos con un anticuerpo marcado contra la inmunoglobulina humana secretada por *E. coli*. En la forma preferente de realización se utiliza para la identificación de los clones buscados el anticuerpo monoclonal YL 1/2, que está dirigido contra la secuencia “TAG”.

- 25 *Leyendas relativas a la figura 1*

Mapa de restricción del vector de expresión pKK233-2 (Amann und Brosius, en el lugar indicado)

- 30 Ptrc significa promotor triptofano-lac híbrido

RBS significa puntos de enlace de los ribosomas

- 35 rrnB significa ARN B ribosómico (5S ARN)

5S significa gen para 5S ARN (que contiene rrnB)

- 40 Como paso previo a la clonación del anticuerpo ADN en el vector de expresión se llevan a cabo las siguientes modificaciones:

1). Los puntos de restricción SalI y EcoRI se separaron junto con el ADN situado entre medias.

- 45 2). El punto de restricción HindIII se transformó en un punto de restricción BamHI.

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

# ES 2 336 444 T3

TABLA 1

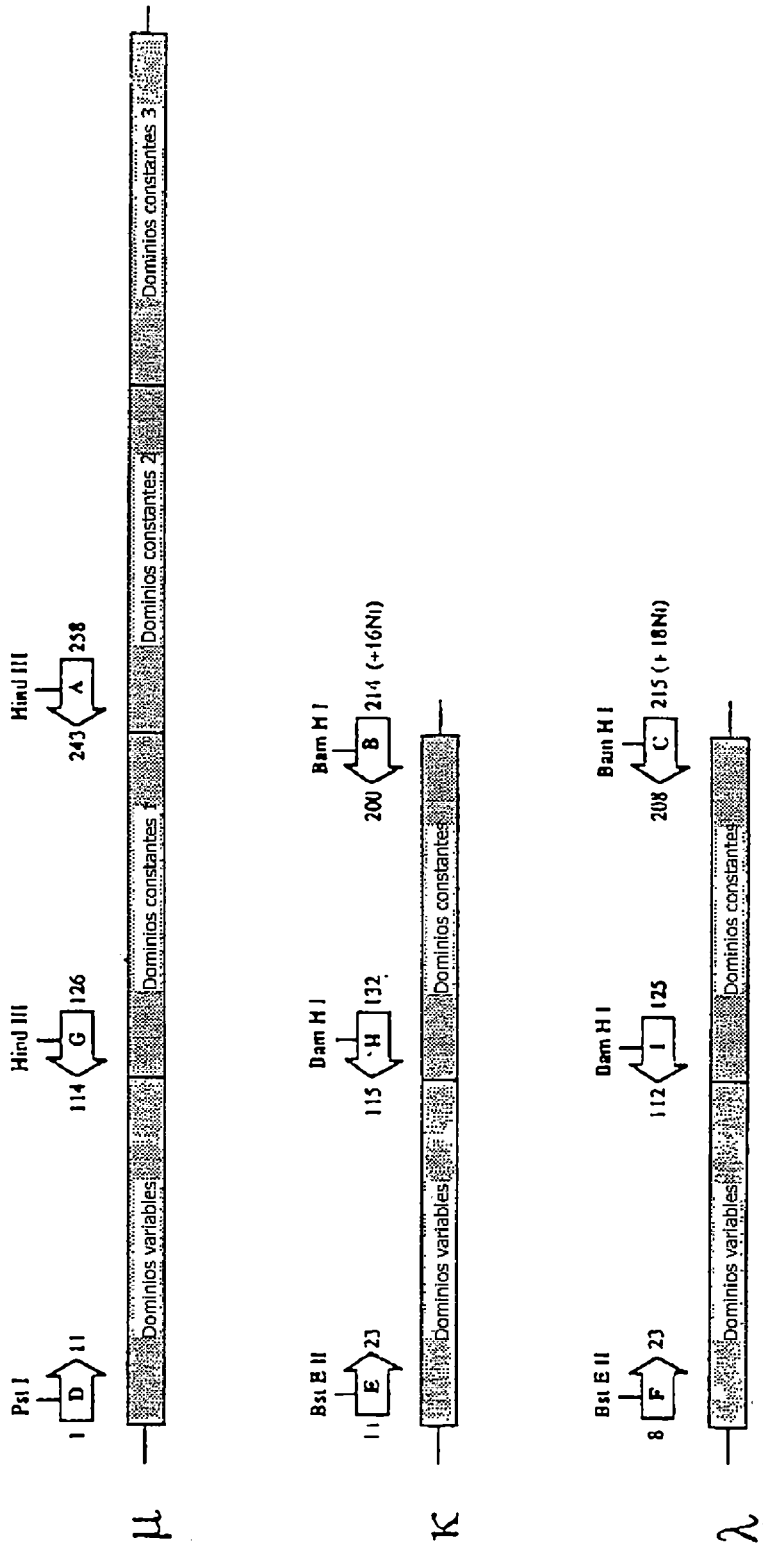
Oligonucleótidos "cebadores" para la amplificación de ADNc con la "reacción en cadena de polimerasa -Polymerase Chain Reaction-"

|   |
|---|
| 1. Oligonucleótidos "cebadores" para la RCP directa   |
| D. cadena- $\mu$  |
| <div style="text-align: center;">Pst I</div> GAGGTGCAGCTG <b>CAG</b> GAGTCTGGGGGAGGCTT      SEQ ID NO: 1                                  |
| E. cadena- $\kappa$   |
| <div style="text-align: center;">Bst E II</div> TGTCTGCATCTGT(A/G)GGAGACAGGGT <b>CACCATCA</b> (A/C)TTG      SEQ ID NO: 2                  |
| F. cadena- $\lambda$  |
| <div style="text-align: center;">Bst E II</div> CCTCAG(C/T)GTCTGGG(A/T)CCCCAGGACAGAG <b>GGTGACCATCTCCTGC</b> SEQ ID NO: 3                 |
| 2. Oligonucleótidos "cebadores" para la RCP inversa (dominios variables más los dominios constantes limítrofes)                           |
| A1. cadena- $\mu$ (sin secuencias de "TAG")   |
| <div style="text-align: center;">Hind III</div> GGGTGGGACGAAGA <b>AAGCTT</b> ACTTAGGGAGGCAGCTCAGCAATCAC      SEQ ID NO: 4                 |
| A2. cadena- $\mu$ (con secuencias de "TAG")   |
| <div style="text-align: center;">Hind III</div> GGGTGGGACGAAGAAGCT <b>AAGCTT</b> GGGAGGCAGCTCAGCAATCAC      SEQ ID NO: 5                  |
| B. cadena- $\kappa$   |
| <div style="text-align: center;">Bam HI</div> GGCACTTC <b>GGATCC</b> TAACACTCTCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGA<br>GCTCAGGCC      SEQ ID NO: 6 |
| C. cadena- $\lambda$  |
| <div style="text-align: center;">Bam HI</div> GTGAGGG(A/T)TG <b>GGATCC</b> TATGAACATTCTGTAGGGGCCACTGT      SEQ ID NO: 7                   |
| 3. Oligonucleótidos "cebadores" para la RCP inversa (dominios variables).   |

# ES 2 336 444 T3

|  |   |
|--|---|
| G1. cadena-μ (sin secuencias de "TAG") |   |
| 5                                      | CACAGGAGACGAGGGGGAA <sup>Hind III</sup> <u>AAGCTT</u> TGGGGCTTATGCACTCCC SEQ ID NO: 8 |
| G2. cadena-μ (con secuencias de "TAG") |   |
| 10                                     | CACAGGAGACGAGGGGGAA <sup>Hind III</sup> <u>AAGCTT</u> TGGGGCGGATGCACTCCC SEQ ID NO: 9 |
| H. cadena-κ                            |   |
| 15                                     | AACAGAGGCG <sup>Bam HI</sup> <u>GATCCT</u> CAATTCAACTGCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAA        |
| 20                                     | GAC SEQ ID NO: 10   |
| I. cadena-λ                            |   |
| 25                                     | AGCTCCTCAGAGGA(C/G)GGCGG <sup>Bam HI</sup> <u>GATCC</u> GAGTGACCTAGGGG                |
|  | SEQ ID NO: 11   |

**TAB. 2** Posiciones de los 'cebadores' para la reacción en cadena de polimerasa (RCP) de anticuerpos ADN



Las secuencias individuales están indicadas en la tabla 1. Los números indican la posición de los aminoácidos de los cuales se derivan los cebadores correspondientes.



TAB. 3

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pFMT PARA LA EXPRESIÓN Y LA SECRECIÓN DE ANTICUERPOS EN BACTERIAS

ADN DE LOS DOMINIOS VARIABLES DE UN ANTICUERPO DE LISOZIMA HUMANO



INTRODUCCIÓN DE PUNTOS DE CORTE POR RESTRICCIÓN POR MEDIO DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA AL PUNTO "SITE DIRECTED"



SÍNTESIS DE LA SECUENCIA "CONDUCTORA" DE LA PECTATLIASA Y DE LOS PUNTOS DE ENLACE DE LOS RIBOSOMAS



LIGAMIENTO EN PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN BACTERIANOS



P/O: Promotor/operador, RBS: Punto de enlace de los ribosomas, P2: Secuencia "conductora" de la pectatliasa, VH: dominios variables de la cadena pesada, VL: dominios variables de la cadena ligera

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|  |  |
|--|--|
| P1   |  |
| Secuencia conductora de la pectatiliasa (P1)   |  |
| M K Y L L P T A A G L L L A Q P A M A O V Q L Q / SEQ ID NO: 12<br>CATGAAATACCTTGGCTAGCGACGCCGTCTCTCTGTCAGTCAAGCCGCCTATGGCGCAAGTTGAGTGAAGA<br>PstI |  |
| P2   |  |
| RBS  | Secuencia conductora de la pectatiliasa (P2) |
| AGTGAAGCCCAAGCTTGATCATTAAAGGAGGAGAAATTAATCTCAATGACTTACTCTGCGACCGCTGGCGCG<br>PstI HindIII   | M K Y L L P T A A A                          |
| G L L L L A A Q P A M A D I / SEQ ID NO: 14<br>GGTCTCTGCTGTGGCGGCTCAGCGGCTATGCGTATATGGAATCCASCT<br>EcoRV BamHI                                     | SEQ ID NO: 15                                |
| Los nucleótidos en cámaras son los nucleótidos límites del plásmido.   |  |
| Las secuencias "conductoras" fueron sintetizadas por medio de la hibridación de los oligonucleótidos siguientes.                                   |  |
| P1   |  |
| a.5 'CATGAAATACCTTGGCTACGGCAGCCGCTGGCTTG3' SEQ ID NO: 16   |  |
| b.3'TTTATGGAGAACGGATGCCGTCGGCGCACCGAACCAGACGACGACCGTCGAGTCGGCGGCTACCGCGTTCAAAGTCGS' SEQ ID NO: 17  |  |

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|  |
|--|
| c. 5'CTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCGGATGGCGCAAGTTCAGCTGCA3' SEQ ID NO: 18   |
| <b>P2</b>  |
| a. 5'GCCAAGCTTGAAATTCATTAAAGAGGAGAAA3' SEQ ID NO : 19  |
| b. 5'TTAACTCCATGAAGTACTTACTGCGGACCGCTGCG3' SEQ ID NO: 20   |
| c. 3'ACGTCGGTGGAACTTAAGTAAATTCCTCTCTTAATTGAGGTACTTCATGAAATGACGGCTGGCGACGGCGCCCAAGGA<br>GAAACAACCCCGGAGTCGGCCCGATACCGACTATAGGCTAGGTCA5' SEQ ID NO: 21 |
| d. 5'GCTCAGCCGGCTATGGCTGATATCGGATCC3' SEQ ID NO: 22  |
| e. 5'GCGGGTCTCCTC-CTGTGGCG3' SEQ ID NO: 23   |
| Las secuencias de Tag fueron sintetizadas por medio de la hibridación de las secuencias siguientes:  |
| a. 5'AGCTTGAAGAAGGTGAAGAATTCTAATG3' SEQ ID NO: 24  |
| b. 5'AGCTCATTAGAATTCTTCACCTTCA3' SEQ ID NO: 25   |

# ES 2 336 444 T3

TABLA 5

Secuencias de nucleótidos de anticuerpo ADN

5 a) Cadena pesada (dominios variables), HuVhly5 HindIII.....

10 .....G V H S Q V Q L Q E S G P G L V R.  
CTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAAGGTCCAACTGGCAGGAGAGCGGTCCAGGTCTTGTGAGA

20 PstI CDR1  
P S Q T L S L T C T V S G F T F S V/G/Y/Y/G/  
CCTAGCCAGACCCCTGAGCCCTGACCTGCACCGTGTCTGGCTTCACCTTCAGCGGCTATGGT

40 BspMI 50  
V/N/A W V R Q P P G R G L E W I G M/T/W/G/  
GTAACCTGGGTGAGACAGCCACCTGGACGAGGTCTTGAGTGGATTGGAATGATTGTTGGGT

60 CDR2 70  
D/G/N/T/D/Y/N/S/A/L/R/S R V T M L V D T  
GATGGAAACACAGACTATAATTCAAGCTCTCAATCCAGAGTGACAATGCTGGTAGACACC

80 90  
S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y  
AGCAAGAACCAGTTCAAGCTGAGACTCAGCAGCGTGACAGCCGCCACACCGCGGTCTAT

100 CDR3 110  
Y C A R E/R/D/Y/R/L/D/Y W G Q G S L V T  
TATTGTGCAAGAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGGTCAGGGCTCCCTCGTCACA

120 BanII  
V S S Stop SEQ ID NO: 26  
GTCTCCTCATAGCTTCCTTACAACTCTCTCTTCTATTCAAGCTTAA..... BamHI SEQ ID NO:27

30 HindIII

b) Cadena ligera (dominios variables), HuVhly5 HindIII.....

10 .....G V H S D I Q N T Q S P S S L S A.  
CTCTCCACAGGTGTCCACTCCGATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCCTGAGCGCC

20 EcoRV CDR1 30  
S V G D R V T I T C R/A/S/G/N/I/E/N/Y/L  
AGCGTGGGTGACAGGCTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCGGTAACTCCACAACCTACCTG

40 BstEII CDR2  
A/ W Y Q Q K P G K A P K L L I Y V/Y/T/T/T  
GCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTACACCACCACC

60 70  
L/A/D G V P S R F S G S G S G T D F T F  
CTGGCTGACGGTGTGCAAGCAGATTCAAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTTC

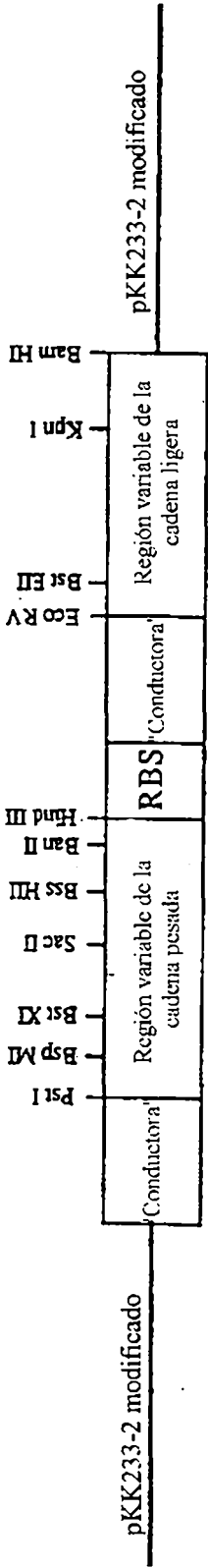
80 90 CDR3  
T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q/E/F/W/S  
ACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCACTTCTGGAGC

100  
T/P/R/T F G Q G T K V E E R R..E Stop SEQ ID NO: 28  
ACCCCAAGGACGTTCCGGCCAGGTACCAAGGTGGAAATCAACGTCAGTAGAATTTAAAC

120 KpnI  
TTTGCTTCCTCAGTGGATCC  
BamHI SEQ ID NO: 29

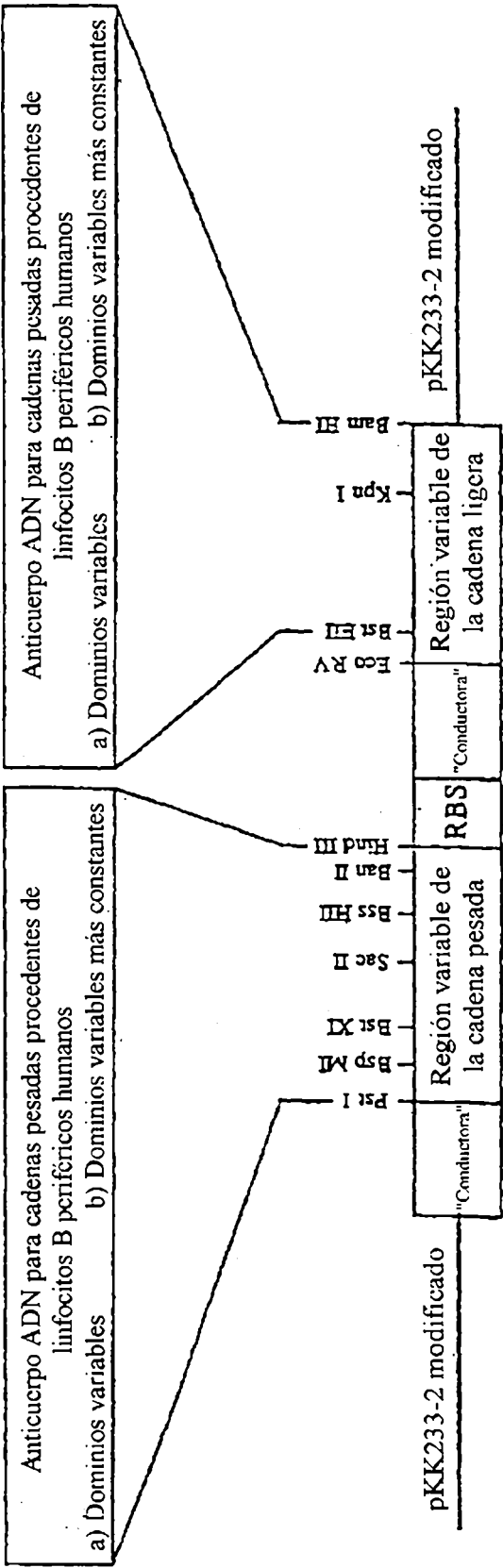
Tab.6

El plásmido de expresión de anticuerpos pFMT



Un RBS está presente por delante del fragmento de la cadena pesada en el plásmido y no ha sido dibujado de nuevo.

TAB. 7      Inserción de las bibliotecas de anticuerpos en el vector de expresión pFMT



## REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la obtención de bibliotecas de anticuerpos humanos; **caracterizado** porque se aísla el ARNm a partir de linfocitos B humanos periféricos, no activados y se transcribe en el ADNc, a continuación se amplifica el ADNc, que codifica anticuerpos, por medio de una reacción en cadena de polimerasa RCP con ayuda de cebadores adecuados, llevándose a cabo a continuación una incorporación en plásmidos de expresión adecuados y a continuación se lleva a cabo la expresión del anticuerpo-ADNc en clones individuales, **caracterizado** porque la maqueta de los cebadores para la reacción inversa para la síntesis de la hebra, no codificante, del ADN de la cadena pesada está  
10 basada en secuencias de IgM y porque se posibilita, por medio del empleo de diversos cebadores para la síntesis de la hebra, no codificante, la obtención de un tipo de anticuerpo, que está constituido por los dominios variables y por los primeros dominios constantes.

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la expresión se lleva a cabo en el plásmido pFMT de conformidad con la tabla 6.

3. Procedimiento para el aislamiento de fragmentos de anticuerpos humanos específicos, **caracterizado** porque se exploran bibliotecas de anticuerpos humanos, preparados según la reivindicación 1 o 2, con antígenos específicos.

20

25

30

35

40

45

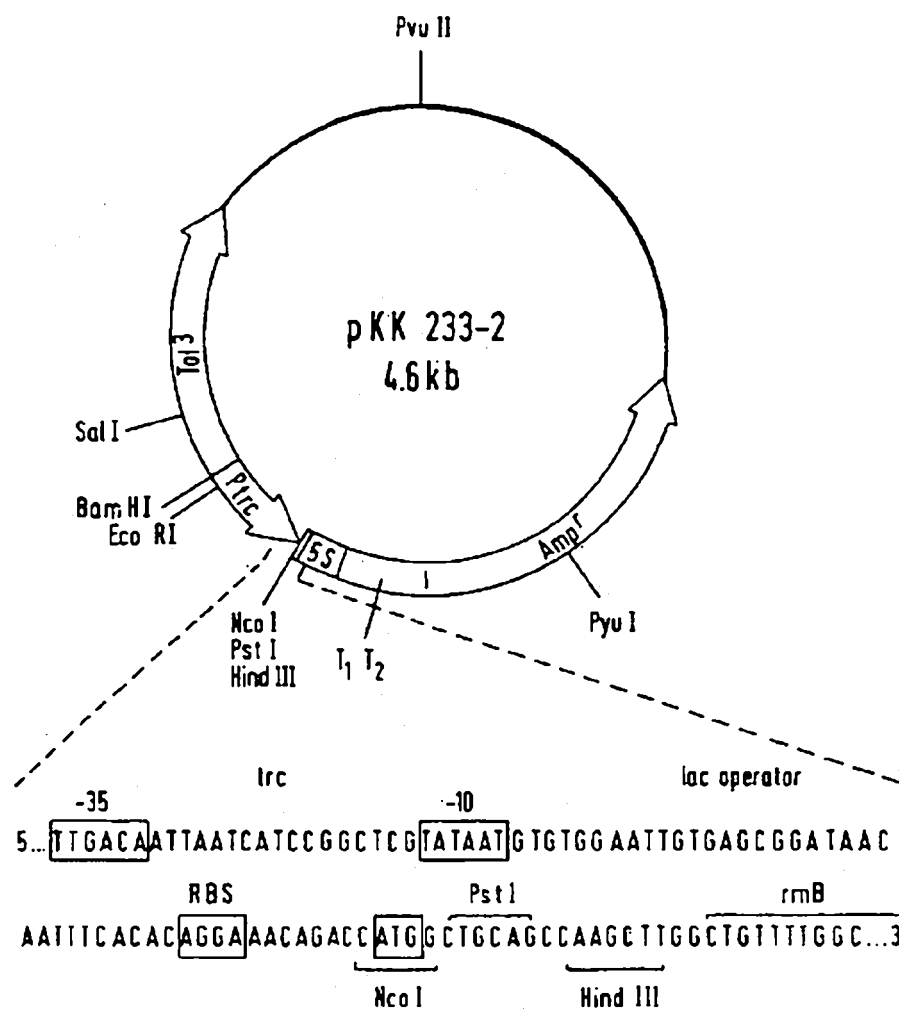
50

55

60

65

Fig. 1





# ES 2 336 444 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <110> Dade Behring Marburg GmbH   |    |
| 5  | <120> Preparación y empleo de genotecas de anticuerpos humanos ("bancos de anticuerpos humanos -Human-Anti-body-Libraries") |    |
|    | <130> 1990/B005 - Ma 833  |    |
|    | <140> EP 04008412.1   |    |
| 10 | <141> 1991-01-28  |    |
|    | <150> EP91101095.7  |    |
|    | <151> 1991-01-28  |    |
|    | <160> 29  |    |
| 15 | <170> PatentIn versión 3.1  |    |
|    | <210> 1   |    |
|    | <211> 32  |    |
| 20 | <212> ADN   |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>   |    |
|    | <400> 1   |    |
| 25 | gaggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tt   | 32 |
|    | <210> 2   |    |
| 30 | <211> 37  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>   |    |
| 35 | <400> 2   |    |
|    | tgtctgcatc tgrggagac agggcacca tcamttg  | 37 |
| 40 | <210> 3   |    |
|    | <211> 44  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>   |    |
| 45 | <400> 3   |    |
|    | cctcagygtc tgggwcccca ggacagaggg tgaccatctc ctgc  | 44 |
| 50 | <210> 4   |    |
|    | <211> 45  |    |
|    | <212> ADN   |    |
| 55 | <213> <i>Homo sapiens</i>   |    |
|    | <400> 4   |    |
| 60 | gggtgggacg aagaagctta ctagggagg cagctcagca atcac  | 45 |
|    | <210> 5   |    |
|    | <211> 45  |    |
| 65 | <212> ADN   |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>   |    |

## ES 2 336 444 T3

|    |  |           |    |
|----|--|-----------|----|
|    | <400> 5  |           |    |
|    | gggtgggacg aagaagctaa gcttgggagg cagctcagca atcac                        |           | 45 |
| 5  | <210> 6  |           |    |
|    | <211> 61   |           |    |
|    | <212> ADN  |           |    |
| 10 | <213> <i>Homo sapiens</i>  |           |    |
|    | <400> 6  |           |    |
| 15 | <b>ggcacttcgg atcctaacac tctcccctgt tgaagctctt tgtgacgggc gagctcaggc</b> | <b>60</b> |    |
|    | <b>c</b>   | <b>61</b> |    |
|    | <210> 7  |           |    |
| 20 | <211> 42   |           |    |
|    | <212> ADN  |           |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>  |           |    |
| 25 | <400> 7  |           |    |
|    | gtgagggtg ggatcctatg aacattctgt aggggccact gt                            |           | 42 |
| 30 | <210> 8  |           |    |
|    | <211> 43   |           |    |
|    | <212> ADN  |           |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>  |           |    |
| 35 | <400> 8  |           |    |
|    | cacaggagac gagggggaaa agctttgggg cttatgcact ccc                          |           | 43 |
| 40 | <210> 9  |           |    |
|    | <211> 43   |           |    |
|    | <212> ADN  |           |    |
| 45 | <213> <i>Homo sapiens</i>  |           |    |
|    | <400> 9  |           |    |
| 50 | cacaggagac gagggggaaa agctttgggg cggatgcact ccc                          |           | 43 |
|    | <210> 10   |           |    |
|    | <211> 54   |           |    |
| 55 | <212> ADN  |           |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>  |           |    |
|    | <400> 10   |           |    |
| 60 | aacaggagcg gatcctcatt tcaactgctc atcagatggc gggaagatga agac              |           | 54 |
|    | <210> 11   |           |    |
| 65 | <211> 39   |           |    |
|    | <212> ADN  |           |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>  |           |    |

# ES 2 336 444 T3

<400> 11

agctcctcag aggasggcgg gatccgagtg acctagggg

39

5

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

15 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln  
20 25

20

<210> 13

<211> 82

<212> ADN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

30 catgaaatac ctcttgcccta cggcagccgc tggcttgctg ctgctggcag ctcagccggc 60  
gatggcgcaa gttcagctgc ag 82

<210> 14

<211> 24

35

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

40

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile  
20

45

<210> 15

<211> 125

50

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

55 ctgcagccaa gcttgaattc attaaagagg agaaattaac tccatgaagt acttactgcc 60  
gaccgctgcg gcgggtctcc tgcgtgtggc ggctcagccg gctatggctg atatcggatc 120  
cagct 125

60

<210> 16

<211> 37

<212> ADN

65 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 336 444 T3

|    |  |            |    |
|----|--|------------|----|
|    | <400> 16   |            |    |
|    | catgaaatac ctcttgcccta cggcagccgc tggcttg                                |            | 37 |
| 5  | <210> 17   |            |    |
|    | <211> 73   |            |    |
|    | <212> ADN  |            |    |
| 10 | <213> <i>Homo sapiens</i>  |            |    |
|    | <400> 17   |            |    |
| 15 | <b>gctgaacttg cgccatcgcc ggctgagctg ccagcagcag caagccagcg gctgccgtag</b> | <b>60</b>  |    |
|    | <b>gcaagaggta ttt</b>  | <b>73</b>  |    |
| 20 | <210> 18   |            |    |
|    | <211> 44   |            |    |
|    | <212> ADN  |            |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>  |            |    |
| 25 | <400> 18   |            |    |
|    | ctgctgctgg cagctcagcc ggcgatggcg caagttcagc tgca                         |            | 44 |
| 30 | <210> 19   |            |    |
|    | <211> 30   |            |    |
|    | <212> ADN  |            |    |
| 35 | <213> <i>Homo sapiens</i>  |            |    |
|    | <400> 19   |            |    |
| 40 | gccaaagcttg aattcattaa agaggagaaa  |            | 30 |
|    | <210> 20   |            |    |
|    | <211>  |            |    |
| 45 | <212> ADN  |            |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>  |            |    |
|    | <400> 20   |            |    |
| 50 | ttaactccat gaagtactta ctgccgaccg ctgcg                                   |            | 35 |
|    | <210> 21   |            |    |
| 55 | <211> 124  |            |    |
|    | <212> ADN  |            |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>  |            |    |
| 60 | <400> 21   |            |    |
|    | <b>agctggatcc gatatcagcc atagccggct gagccgcaa cagcaggaga cccgccgcag</b>  | <b>60</b>  |    |
| 65 | <b>cggtcggcag taagtacttc atggagttaa tttctcctct ttaatgaatt caagcttggc</b> | <b>120</b> |    |
|    | <b>tgca</b>  | <b>124</b> |    |

## ES 2 336 444 T3

|    |                                  |    |
|----|----------------------------------|----|
|    | <210> 22                         |    |
|    | <211> 30                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
| 5  | <213> <i>Homo sapiens</i>        |    |
|    | <400> 22                         |    |
| 10 | gctcagccgg ctatggctga tatcggatcc | 30 |
|    | <210> 23                         |    |
|    | <211> 21                         |    |
| 15 | <212> ADN                        |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>        |    |
|    | <400> 23                         |    |
| 20 | gcgggtctcc tgctgttggc g          | 21 |
|    | <210> 24                         |    |
| 25 | <211> 28                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>        |    |
| 30 | <400> 24                         |    |
|    | agcttgaaga aggtgaagaa ttctaag    | 28 |
| 35 | <210> 25                         |    |
|    | <211> 28                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
| 40 | <213> <i>Homo sapiens</i>        |    |
|    | <400> 25                         |    |
| 45 | agctcattag aattcttcac cttcttca   | 28 |
|    | <210> 26                         |    |
|    | <211> 120                        |    |
| 50 | <212> PRT                        |    |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>        |    |
| 55 |                                  |    |
| 60 |                                  |    |
| 65 |                                  |    |

# ES 2 336 444 T3

<400> 26

5 Gly val His Ser Gln val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu val  
1 5 10  
Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr  
20 25 30  
10 Phe Ser Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly  
35 40 45  
15 Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn  
50 55 60  
Ser Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn  
65 70 75 80  
20 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
85 90 95  
25 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

30 <210> 27  
<211> 407  
<212> ADN  
35 <213> *Homo sapiens*  
<400> 27

40 ctctccacag gtgtccactc ccaggtccaa ctgcaggaga gcggtccagg tcttgtgaga 60  
cctagccaga ccctgagcct gacctgcacc gtgtctggct tcaccttcag cggtatggt 120  
gtaaactggg tgagacagcc acctggacga ggtcttgagt ggattggaat gatttggggg 180  
45 gatggaaaca cagactataa ttcagctctc aaatccagag tgacaatgct ggtagacacc 240  
agcaagaacc agttcagcct gagactcagc agcgtgacag ccgccgacac cgcggtctat 300  
tattgtgcaa gagagagaga ttataggctt gactactggg gtcagggctc cctcgtcaca 360  
50 gtctctcat aagcttcctt acaacctctc tcttctattc agcttaa 407

55 <210> 28  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

60

65

# ES 2 336 444 T3

<400> 28

```

5      Gly Val His Ser Asp Ile Gln Asn Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
      1      5      10      15
      Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn
      20      25      30
10     Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
      35      40      45
15     Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
      50      55      60
      Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
      65      70      75      80
20     Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
      85      90      95
      Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100      105      110
25     Glu

```

<210> 29

<211> 381

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

```

      ctctccacag gtgtccactg ggatatccag atgaccacaga gccaagcag cctgagcgcc      60
30     agcgtgggtg acaggggtgac catcacctgt agagccagcg gtaacatcca caactacctg      120
      gcttggtacc agcagaagcc aggtaaggct ccaaagctgc tgatctacta caccaccacc      180
45     ctggctgacg gtgtgccaag cagattcagc ggtagcggtg gcggtaccga cttcaccttc      240
      accatcagca gcctccagcc agaggacatc gccacctact actgccagca cttctggagc      300
      accccaagga cgttcggcca aggtaccaag gtggaaatca aacgtgagta gaatttaaac      360
50     ttgcttcct cagttggatc c                                     381

```