

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 225 816**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/13** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.1991 E 91101095 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **14.05.2014 EP 0440147**

54

Título: **Producción y utilización de bancos de genes de anticuerpos humanos (bibliotecas de anticuerpos humanos)**

30

Prioridad:

**01.02.1990 DE 4002898**

**09.02.1990 DE 4003881**

45

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

**21.08.2014**

73

Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS  
PRODUCTS GMBH (100.0%)  
GÖRZHÄUSER HOF, EMIL-VON-BEHRING-  
STRASSE 76  
35041 MARBURG, DE**

72

Inventor/es:

**LITTLE, MELVYN, DR.;  
BREITLING, FRANK BERTHOLD;  
SEEHAUS, THOMAS, DR.;  
DÜBEL, STEFAN y  
KLEWINGHAUS, IRIS**

74

Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

ES 2 225 816 T5

**PRODUCCIÓN Y UTILIZACIÓN DE BANCOS DE GENES DE ANTICUERPOS HUMANOS**  
**("BIBLIOTECAS DE ANTICUERPOS HUMANOS").**

**DESCRIPCIÓN**

5 La invención se refiere a la producción y la utilización de bancos de genes de anticuerpos (AK) humanos. Partiendo de una mezcla de linfocitos B humanos, se transcribe su ARNm (ácido ribonucleico mensajero) en ADNc (ácido desoxirribo-nucleico complementario) utilizando cebadores oligo-DT. A continuación tiene lugar una amplificación del ADNc específico para AK mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) utilizando secuencias apropiadas de cebadores oligonucleótidos. Mediante expresión de este ADNc amplificado  
 10 específico para AK en un vector bacteriano de expresión, por ejemplo el vector pFMT descrito seguidamente, en *Escherichia coli* (*E. coli*), se dispone así de una biblioteca de anticuerpos humanos con un repertorio amplio para el cribado ("screening") *in vitro* con antígenos seleccionados.

15 Se estima que el sistema inmunitario de un ser humano o de un animal mamífero posee entre  $10^6$  y  $10^8$  anticuerpos diferentes. Este número de anticuerpos es suficiente para provocar una reacción inmunitaria del cuerpo, tanto contra la totalidad de antígenos presentes en la naturaleza como también contra antígenos artificiales. Si además se considera que con frecuencia varios anticuerpos reaccionan con el mismo antígeno, el repertorio de anticuerpos realmente diferentes ha de establecerse más bien en la gama de  $10^6$  a  $10^7$ .

20 Hasta ahora, se obtenían anticuerpos específicos siempre partiendo de una inmunización con el respectivo antígeno, por ejemplo de una inyección del antígeno en el organismo o una incubación de células de bazo *in vitro* con este antígeno. En el caso de anticuerpos policlonales, se puede aislar a continuación la inmunoglobulina a partir del suero y se pueden obtener a partir de ello los anticuerpos específicos, por ejemplo mediante procedimientos de absorción. Los anticuerpos monoclonales se aíslan a partir de los sobrenadantes celulares o a partir del material lisado de células de tumor de bazo (células de hibridoma) clonadas, fusionadas con linfocitos B individuales. Los procedimientos  
 25 antes expuestos no son apropiados en particular para la producción de anticuerpos humanos específicos o de anticuerpos monoclonales humanos.

30 La presente invención se formuló por lo tanto la misión de desarrollar un método realizable de un modo general para la producción de anticuerpos monoclonales humanos específicos (huMAK's) o de partes de anticuerpos, que contienen el sitio de fijación a antígenos.

35 Se encontró que los huMAK's buscados o sus partes, que contienen el dominio variable que se fija a un antígeno, se pueden aislar a partir de bancos de genes de inmunoglobulina humana. En primer término, partiendo una mezcla de linfocitos B humanos no activados, se aisló el ARNm de éstos y, con ayuda de cebadores oligo-dT, se transcribió en ADNc. Una amplificación específica de la población de ADNc's de anticuerpos dentro de la agrupación obtenida de ADNc's, se consiguió mediante la utilización de PCR. Para esto se utilizaron determinados "cebadores" oligonucleótidos, que son homólogos respecto a secuencias conservadas en ambos extremos del ADNc de anticuerpos (véase más adelante y los ejemplos). La concepción de los cebadores para la reacción de retorno,  
 40 con el fin de realizar la síntesis de la cadena no codificadora del ADN de la cadena pesada, se basa en secuencias de inmunoglobina M o IgM (subclase III, puesto que ésta abarca la mayor parte de las secuencias de IgM). Las moléculas de IgM están presentes en linfocitos B no activados con mayor frecuencia que todas las otras clases de inmunoglobulinas. Por el contrario, las secuencias de IgG predominan en linfocitos B activados, cuyo repertorio de diferentes anticuerpos es muchísimo más pequeño. En el caso de una biblioteca de IgG podría existir además el peligro de que una IgG o unas pocas IgG's, expresadas de manera especialmente intensa, dominasen en la biblioteca.  
 45

50 Hasta 30 rondas de amplificación se llevaron a cabo de una manera conveniente. Los cebadores ("primer") oligonucleótidos contienen apropiados sitios de restricción, con el fin de insertar el ADN amplificado, por ejemplo en el plásmido de expresión de anticuerpos pFMT (véase más adelante). Este plásmido de expresión hace posible la expresión de ADNc de anticuerpo y la subsiguiente segregación de los productos de expresión en bacterias (*E. coli*). El operón de anticuerpo del plásmido contiene las secuencias de las partes variables tanto de la cadena pesada como también de la cadena ligera de un anticuerpo. Secuencias de guía ("leader") apropiadas, procedentes del extremo terminal de amino de una proteína bacteriana, hacen posible la segregación de las partes de anticuerpos. Las secuencias de guía se disocian al realizar la secreción de una enzima bacteriana.  
 55 Durante la secreción de los productos del ADNc de anticuerpo se asocian las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo (con o sin un dominio constante colindante). De este modo se forma un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que contiene un sitio funcional de fijación a un antígeno. Estructuras artificiales (constructos) similares para anticuerpos individuales han sido descritas también por otros autores (Better y colaboradores (1988), Science 240, 1041, y Skerras & Plückthun (1988), Science 240, 1038).  
 60

La amplificación de ADN's, que codifica para las partes variables de anticuerpos, se describió ciertamente por otros autores (Orlandi y colaboradores (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833;

Sastry y colaboradores, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 5728; Ward y colaboradores (1989), Nature 341, 544; Huse y colaboradores (1989), Science 246, 275). En este caso, sin embargo, se aisló el ARNm procedente de células de hibridoma o de linfocitos de bazo, que entre otras cosas codifica también para anticuerpos, *después* del tratamiento con un antígeno determinado. Por lo tanto, se emplearon allí también secuencias de cebadores, que se basan solamente en secuencias de IgG. Esto naturalmente presenta ventajas allí donde se busca el mayor número posible de clones de ADN de anticuerpos, que proceden de linfocitos activados. Con cebadores procedentes de secuencias de IgG, son muchísimo mayores las posibilidades de encontrar clones que contengan ADN que codifiquen para anticuerpos contra el antígeno inyectado. Hay que añadir a esto el hecho de que en los trabajos precedentes se sintetizaron ADN de anticuerpos murinos, y por lo tanto no humanos, y adicionalmente se amplificaron excluyendo zonas de la cadena lambda.

En la presente invención se utilizan por el contrario secuencias de cebadores que son homólogas con respecto a secuencias existentes en los dominios constantes de ADNc de IgM. Así, la invención se puede realizar de un modo óptimo, es decir que se puede poner a disposición una multiplicidad muy grande de anticuerpos, a saber el repertorio total de anticuerpos, en forma de una biblioteca. La expresión, preferiblemente en *E. coli*, proporciona entonces la buscada biblioteca de anticuerpos humanos, en la que los anticuerpos humanos o las partes de tales anticuerpos que se buscaban se encuentran por cribado de clones bacterianos con el antígeno elegido.

En la tabla 1 se recopilan cebadores oligonucleótidos apropiados para la amplificación. Las posiciones de los cebadores antes mencionados en las cadenas  $\mu$ , kappa y lambda se representan esquemáticamente en la Tabla 2. Las construcciones biológico-moleculares en particular y entre ellas también el vector de expresión, es decir el plásmido de expresión de anticuerpos, pFMT, se describen en los siguientes ejemplos.

La invención se refiere en consecuencia a bibliotecas de anticuerpos humanos, que se producen por medio de transcripción del ARNm procedente de linfocitos B humanos (periféricos) no activados, mediante cebadores oligo-dT, subsiguiente amplificación mediante PCR utilizando cebadores que contienen secuencias homólogas con respecto a zonas conservadas de ADNc de IgM, y subsiguiente incorporación en plásmidos de expresión apropiados para realizar la expresión en microorganismos, preferiblemente en el vector de expresión pFMT para la expresión en *E. coli*. En una forma preferida de realización, se incorpora adicionalmente una secuencia, que codifica para un péptido marcador, por ejemplo una secuencia "TAG", de forma tal que se pueden detectar de una manera sencilla los productos de expresión con anticuerpos monoclonales establecidos contra el péptido marcador (Wehland y colaboradores, (1984), EMBO J. 3, 1295).

Además incluye la invención la utilización de las antes citadas bibliotecas de anticuerpos humanos para el aislamiento de anticuerpos humanos o partes de tales anticuerpos que se buscan, con un sitio funcional de fijación a antígenos, mediante "cribado" con antígenos seleccionados, así como procedimientos para el aislamiento de los mencionados anticuerpos humanos o sus partes que fijan antígenos, y también procedimientos para generar las mencionadas bibliotecas de anticuerpos humanos.

Los siguientes ejemplos ejecutan la invención de manera adicional, pero sin limitarla. Finalmente, la invención está contenida en las reivindicaciones.

### **Ejemplos:**

#### **Ejemplo 1: Producción de un vector de expresión de anticuerpos**

El plásmido pKK233-2 (Amann y Brosius, (1985) Gene 40, 183, y Straus y Gilbert, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 2014) se escogió como vector de base para la constitución del vector de expresión de anticuerpos (Figura 1).

Antes de la incorporación del operón de anticuerpos, se cortó el plásmido con Sall y BamHI, los extremos se rellenaron con polimerasa de Klenow y se ligaron. De este modo se eliminaron estos dos sitios de restricción y el ADN situado en medio. Además, el plásmido se disoció con HindIII, los extremos se rellenaron con la polimerasa de Klenow y se ligaron con enlazadores de BamHI. Mediante esta operación se eliminó el sitio de restricción HindIII y se insertó un sitio de BamHI. En este plásmido modificado se insertó el ADN de anticuerpos. Una vía esquemática de construcción del operón de anticuerpos, que codifica para un ARNm de anticuerpo bicistrónico, se muestra en la Tabla 3. Con el fin de hacer posible la segregación del anticuerpo, se utilizó la secuencia de guía de la enzima bacteriana pectato liasa. La secuencia de guía de esta enzima ya se ha utilizado para la expresión y la segregación de un anticuerpo quimérico de ratón y de ser humano (fragmento Fab, Better y colaboradores, véase más arriba) así como de la parte variable de un anticuerpo "humanizado" (Ward y colaboradores, véase más arriba, Huse y colaboradores, véase más arriba). El ADN para la primera secuencia de guía (P<sub>1</sub> delante de la cadena pesada) y la secuencia para un segundo sitio de fijación a ribosomas (RBS) y una segunda secuencia de guía (P<sub>2</sub> delante de la cadena ligera) se sintetizaron a partir de varios oligonucleótidos (Tabla 4).

Los ADNc de anticuerpos, que codifican para las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo humano (HuVhlys o bien HuV1lys; Riechmann y colaboradores, (1988) J. Mol. Biol. 203, 825), los obtuvo el Dr. G. Winter (Cambridge, Reino Unido). Los sitios de restricción con HindIII (HuVhlys) y con EcoRV (HuV1lys) se introdujeron para hacer posible la inserción del ADNc de anticuerpos en el vector de expresión. Otros sitios de restricción para BanII (HuVhlys) y para BstEII o bien KpnI (HuV1lys) se introdujeron para cambiar "en bloque" zonas hipervariables. Junto al extremo de la secuencia de ADNc de HuVhlys se incorporó una señal de detención (Stop). Se eliminó un sitio para BanII en la cadena ligera. Estas modificaciones se llevaron a cabo mediante una mutagénesis dirigida a un sitio ("site directed mutagenesis") en el bacteriófago M13mp18 (Zoller y Smith, Meth. Enzymol. 100, 468-500). La secuencia del ADN de anticuerpos terminado se muestra en la tabla 5.

Para la inserción de la secuencia de guía P<sub>1</sub> (Tabla 4), el plásmido modificado pKK233-2 se digirió con las enzimas de restricción NcoI y PstI y la P<sub>1</sub> se insertó entre estos sitios (pKK233-2-P<sub>1</sub>). Otras etapas de clonación, salvo la última etapa, se emprendieron con el plásmido pUC18. La razón de ello consiste en que la presencia de partes individuales del operón de anticuerpos en el vector de expresión perjudica el crecimiento del anfitrión bacteriano.

Antes de la clonación en pUC18 se tuvo que eliminar su sitio de restricción BamHI. Después de una digestión con BamHI, los extremos monocatenarios se rellenaron con el fragmento de Klenow y se volvieron a ligar. Este plásmido modificado se digirió luego con PstI y HindIII y se introdujeron y ligaron el P<sub>2</sub> más el RBS entre estos sitios de restricción (pUC18-P<sub>2</sub>). En esta operación desaparece el sitio original de restricción HindIII del plásmido y se incorpora un nuevo sitio de restricción HindIII. El pUC18-P<sub>2</sub> se digirió luego con PstI e HindIII, y el ADN de la cadena pesada (inserción PstI-HindIII procedente de M13) se ligó en estos dos sitios (pUC18-HP<sub>2</sub>). Este plásmido se digirió luego con EcoRV y BamHI, y el ADN de la cadena ligera (inserción EcoRV-BamHI procedente de M13) se ligó allí dentro (pUC18-HP<sub>2</sub>L).

En una forma de realización preferida, se introdujo y ligó en la nueva interfaz HindIII una secuencia "TAG" (Tabla 4). La secuencia "TAG" codifica para el péptido Glu-Glu-Gly-Glu-Glu-Phe y es reconocida por el anticuerpo monoclonal YL 1/2 (Wehland y colaboradores (1984) EMBO J. 3, 1295). El plásmido resultante es el pUC-HTP<sub>2</sub>L.

Para la inserción del HP<sub>2</sub>L y del HTP<sub>2</sub>L respectivamente en el vector de expresión, se cortaron los pUC18-HP<sub>2</sub>L y pUC-HTP<sub>2</sub>L respectivamente con PstI y BamHI, y el correspondiente fragmento de restricción se ligó en cada caso en el plásmido modificado pKK233-2-P<sub>1</sub> en estos dos sitios de restricción. Una representación esquemática del vector de expresión pFMT acabado se muestra en la Tabla 6.

### Ejemplo 2: Obtención de ARN a partir de linfocitos B humanos

Para enriquecer células B periféricas a partir de sangre humana, ésta se diluyó a 1:1 con PBS (de "phosphate buffered saline" = solución salina tamponada con fosfato) y se centrifugó a través de una almohadilla de Ficoll® (de Pharmacia) (1,077 kg/l). Las células de la interfaz se lavaron dos veces con PBS y se incubaron a 37°C durante una hora en un medio RPMI que contenía 10% de suero de ternero fetal, sobre un substrato de plástico (frasco de cultivo). Las células adherentes (monocitos y macrófagos) se adhieren al recipiente de cultivo y de esta manera se pudieron eliminar de la formulación. Las células no adherentes se recogieron por centrifugación y se homogeneizaron en isotiocianato de guanidinio 4,4 M, mercapto-etanol al 5% y lauroil-sarcosina al 2%. Luego, el material homogeneizado se centrifugó a través de 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 una noche a -20°C con etanol al 70% y 1/20 volúmenes de LiCl 8 M.

Con el fin de obtener una pluralidad todavía mayor de anticuerpos con diferente especificidad, se mezclaron preparaciones de ARN, en cada caso de 500 ml, de la sangre de 20 personas diferentes.

### Ejemplo 3: Amplificación del ADN de anticuerpo

El ARNm se purificó mediante oligo-dT-sefariosa (kit de Pharmacia) y se transcribió con transcriptasa inversa (kit de Amersham) y cebador oligo-dT en ADNc. Los productos se utilizaron directamente en la "reacción en cadena de la polimerasa" ("polymerase chain reactor" = PCR). Los cebadores de PCR y los sitios de hibridación se muestran en las Tablas 1 y 2 respectivamente. Mediante una combinación del ADN  $\mu$  obtenido con un ADN kappa o bien lambda en el vector pMFT, se produjeron dos diferentes bancos de expresión. La utilización de diferentes cebadores para la síntesis de las cadenas no codificadoras en la reacción en cadena de la polimerasa hace posible la preparación de dos diferentes tipos de anticuerpos, que en uno de los casos contienen solamente el dominio variable y en el otro de los casos contienen adicionalmente un dominio constante (similar al fragmento Fab de un anticuerpo). Para efectuar la PCR se hicieron reaccionar 4  $\mu$ l de una

síntesis de ADNc en cada caso con 0,2 nmol de los dos cebadores en un volumen de 50  $\mu$ l. La composición de reacción contenía 100 mM de KCl, 0,1% de gelatina y 2,5 U de polimerasa Taq. Después de 30 ciclos de polimerización, que consistían en 1 min. a 95°C, 2 min. a 55°C y 2 min. a 72°C, el ADN se precipitó con etanol.

5 **Ejemplo 4: Inserción del ADN de anticuerpo en el plásmido de expresión**

10 El ADN precipitado se tomó en un tampón de carga para geles de agarosa [(0,1% de azul de bromofenol, 7% de Ficoll® [Pharmacia]) y se separó mediante agarosa al 2% a 10 V/cm en un tampón TBE (45 mM de tris-borato, de pH 8,0, 10 mM de EDTA). El ADN de anticuerpo sintetizado se identificó en base a su peso molecular y se eluyó a partir del gel. Tras la precipitación con etanol se tomó en un tampón para las correspondientes enzimas de restricción y se cortó con las correspondientes enzimas de restricción (Boehringer Mannheim) (ver al respecto las Tablas 1 y 2). Después de una precipitación en etanol, se incorporó y ligó en el vector pFMT asimismo cortado, tal como se muestra esquemáticamente en la Tabla 7.

15 **Ejemplo 5: Expresión y “cribado” de anticuerpos en *E. coli***

20 Células de *E. coli* competentes se transfectan con plásmidos pFMT, que contienen la biblioteca de ADN de anti-cuerpos insertada, se extienden sobre placas de agarosa y a continuación se incuban con filtros de nitrocelulosa, que están recubiertos con el antígeno buscado. Después de la eliminación de anticuerpos fijados de una manera no específica, los clones activos se identifican con un anticuerpo marcado frente a las inmunoglobulinas humanas segregadas a partir de *E. coli*. En la forma de realización preferida, con el fin de identificar los clones buscados, se utiliza el anticuerpo monoclonal YL 1/2, que está dirigido contra la secuencia “TAG”.

**Leyenda de la Figura 1:**

Mapa de restricciones del vector de expresión pKK233-2 (Amann y Brosius, véase más arriba).

25 P<sub>trc</sub> significa promotor híbrido de triptófano y lac

RBS significa sitio de fijación a ribosomas

rrnB significa ARN B ribosomal (ARN de 5S)

5S significa gen para ARN de 5S (contiene rrnB).

30 Antes de la clonación de un ADN de anticuerpo en el vector de expresión, se llevaron a cabo las siguientes modificaciones:

1. Los sitios de restricción Sall y EcoRI se eliminaron junto con el ADN situado en medio.
2. El sitio de restricción HindIII se transformó en un sitio de restricción BamHI.

TABLA 1

Listado de Secuencias

*Cebadores oligonucleótidos para la amplificación de ADNc con la reacción en cadena de la polimerasa*

5

1. Cebadores oligonucleótidos para la PCR hacia adelante

**D. Cadena  $\mu$**

10

GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTT  
Pst I

**E. Cadena  $\kappa$**

TGTCTGCATCTGT(A/G)GGAGACAGGGTCCATCA(A/C)TTG  
Bst E II

**F. Cadena  $\lambda$**

15

CCTCAG(C/T)GTCTGGG(A/T)CCCCAGGACAGAGGGTGACCATCTCCTGC  
Bst E II

2. *Cebadores oligonucleótidos para la PCR de retorno (dominio variable más dominio constante colindante)*

**A1. Cadena  $\mu$  (sin secuencias "TAG")**

20

GGGTGGGACGAAGAAGCTTACTTAGGGAGGCAGCTCAGCAATCAC  
Hind III

**A2. Cadena  $\mu$  (con secuencias "TAG")**

GGGTGGGACGAAGAAGCTAAGCTTGGGAGGCAGCTCAGCAATCAC  
Hind III

**B. Cadena  $\kappa$**

25

GGCACTTCGGATCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGA  
 GCTCAGGCC  
Bam H I

**C. Cadena  $\lambda$**

GTGAGGG(A/T)TGGGATCCTATGAACAATTCTGTAGGGGCCACTGT  
Bam H I

3. *Cebadores oligonucleótidos para la PCR de retorno (dominio variable)*

**G1. Cadena  $\mu$  (sin secuencias "TAG")**

30

CACAGGAGACGAGGGGGAAAGCTTTGGGGCTTATGCACTCCC  
Hind III

**G2. Cadena  $\mu$  (con secuencias "TAG")**

CACAGGAGACGAGGGGGAAAGCTTTGGGGCGGATGCACTCCC  
Hind III

**H. Cadena  $\kappa$**

AACAGAGGCGGATCCTCAATTCAACTGCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAA  
 GAC  
Bam H I

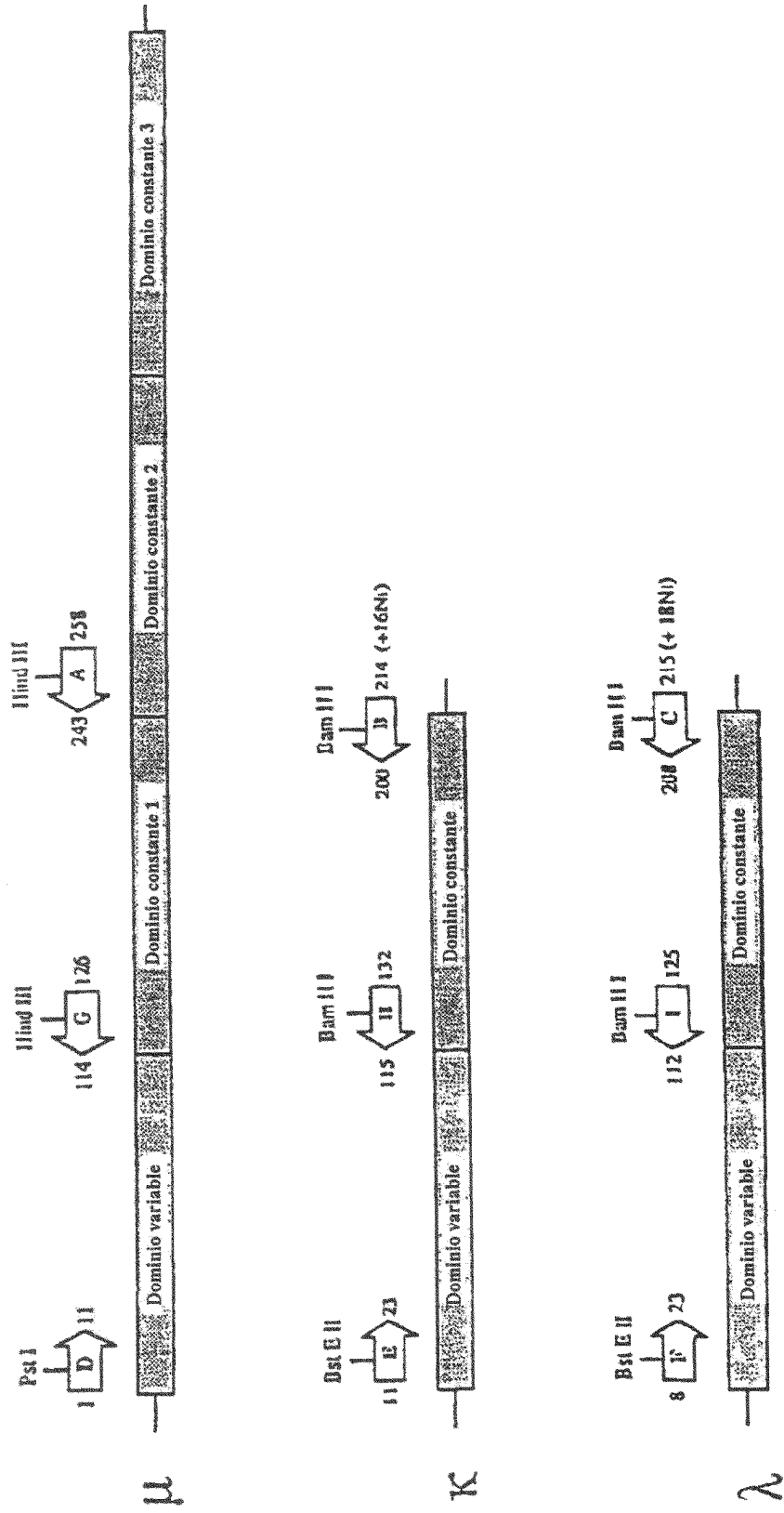
35

**I. Cadena  $\lambda$**

AGCTCCTCAGAGGA(C/G)GGCGGGATCCGAGTGACCTAGGGG  
Bam H I

**Tabla 2**

Posiciones del cebador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un ADN de anticuerpo.



Las secuencias individuales se exponen en la Tabla 1. Las cifras indican las posiciones de los aminoácidos de las que se derivan los respectivos cebadores.

**Tabla 3**

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

ADN DE LOS DOMINIOS VARIABLES DE UN ANTICUERPO DE LIOSIZIMA HUMANA



INTRODUCCIÓN DE SITIOS DE CORTE POR RESTRICCIÓN  
MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA A UN SITIO



SÍNTESIS DE LA SECUENCIA DE GUÍA DE LA PECTATO LIASA  
Y DEL SITIO DE FIJACIÓN A RIBOSOMAS



LIGACIÓN EN PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN BACTERIANOS



P/O: promotor / operador, RBS: sitio de fijación a ribosomas, P2: secuencia de guía de la peptato liasa  
VH: dominio variable de la cadena pesada, VL: dominio variable de la cadena ligera.



TABLA 5

Secuencias de nucleótidos de ADN de anticuerpos

a) cadena pesada (dominio variable) HuVhlys

HindIII.....

.....G V H S Q V Q L Q E S G P G L V R.  
 CTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACTCCAGGAGAGCGGTCCAGGTCTTGTGAGA  
 PstI

.....P S Q T L S L T C T V S G F T F S V/G/Y/G/ CDR1  
 CCTAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGTCTGGCTTCACCTCAGCGGCTATGGT  
 BspMI

.....V/N/ W V R Q P P G R G L E W I G M/I/W/G/ CDR2  
 GTAAACTGGGTGAGACAGCCACCTGGACGAGGTCTTGAGTGGATTGGAATGATTTGGGGT  
 CDR2 60 70  
D/G/N/T/D/Y/N/S/A/L/K/S R V T M L V D T.  
 GATGGAAACACAGACTATAATTTCAGCTCTCAAATCCAGAGTGACAATGCTGGTAGACACC

.....S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y  
 AGCAAGAACCAGTTTCAGCCTGAGACTCAGCAGCGTGACAGCCGCCGACACCCCGGTCTAT  
 SacII

.....Y C A R E/R/D/Y/R/L/D/Y W G Q G S L V T. CDR3  
 TATTGTGCAAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGGTCAAGGGCTCCCTCGTCACA  
 BanII

.....V S S Stop  
 GTCCTCCTCATPAGCTTCCTTACAACCTCTCTCTTCTATTTCAGCTTAA..... BamHI  
 HindIII

b) cadena ligera (dominio variable) HuVllys

HindIII.....

.....G V H S D I Q N T Q S P S S L S A.  
 CTCTCCACAGGTGTCCACTCCGATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCC  
 EcoRV

.....S V G D R V T I T C R/A/S/G/N/I/H/N/Y/L/ CDR1 30  
 AGCGTGGGTGACAGGGTGCATCACCTGTAGAGCCAGCGGTAACATCCACAACCTACCTG  
 BstEII

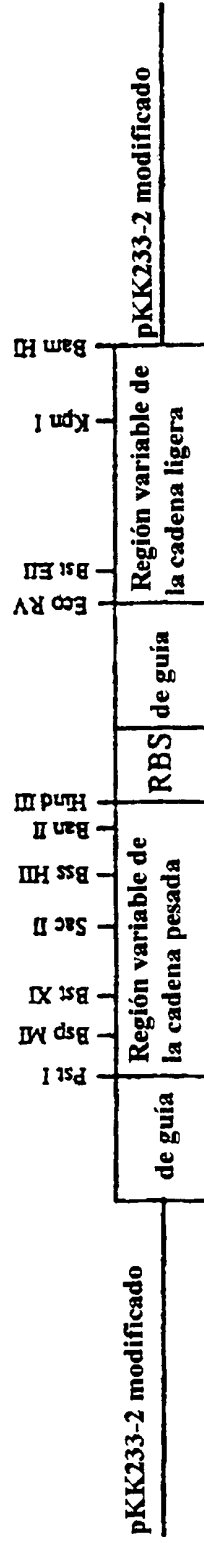
.....A/ W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y/T/T/T/ CDR2  
 GCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTACACCACCACC  
 CDR2 40 50  
L/A/D/ G V P S R F S G S G S G T D F T F  
 CTGGCTGACGGTGTGCCAAGCAGATTTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTTC

.....T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q/E/F/W/S/ CDR3  
 ACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCACTTCTGGAGC  
 CDR3 60 70

.....T/P/R/T/ F G Q G T K V E I R R. E Stop  
 ACCCCCAAGGACGTTCCGGCCAGGTACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAGTAGAATTTAAAC  
 KpnI  
 TTTGCTTCCTCAGTTGGATCC  
 BamHI

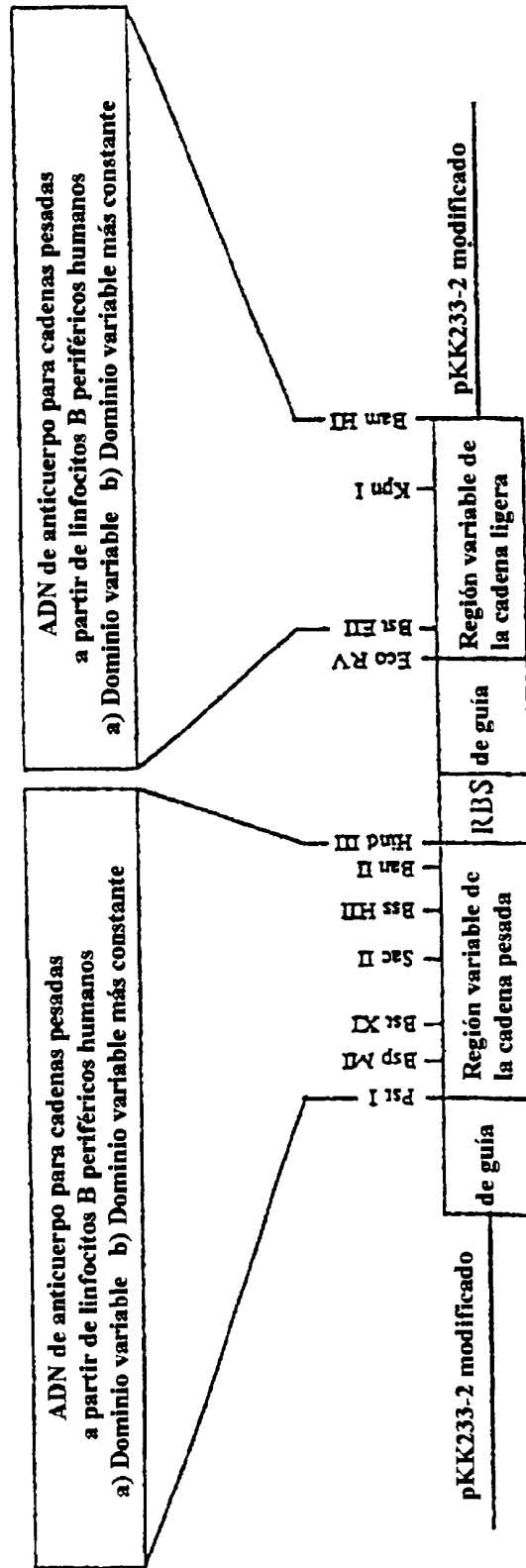
**Tabla 6**

El plásmido de expresión de anticuerpos pFMT



Un RBS está presente en el plásmido delante de la parte de cadena pesada y no se dibuja de nuevo.

**Tabla 7:** Inserción de las bibliotecas de anticuerpos en el vector de expresión pFMT



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la producción de bibliotecas de anticuerpos humanos,  
**caracterizado** porque se aísla ARNm a partir de linfocitos B humanos periféricos no activados y se transcribe en ADNc, a continuación el ADNc que codifica para los anticuerpos se amplifica por medio de PCR mediante cebadores apropiados, a continuación de ello se lleva a cabo una incorporación en plásmidos de expresión apropiados y finalmente se efectúa una expresión del ADNc de anticuerpos en clones individuales, y  
10 porque mediante los cebadores utilizados se amplifican en cada caso solamente las regiones variables, los plásmidos de expresión no codifican para ningún dominio constante de un anticuerpo y  
porque la concepción de los cebadores utilizados para la reacción de retorno, con el fin de sintetizar la cadena no codificadora de la cadena pesada, se basa en secuencias de IgM.
- 15 2. Procedimiento según con la reivindicación 1,  
**caracterizado porque** la expresión se efectúa en el plásmido pFMT según la Tabla 6.
3. Procedimiento para el aislamiento de anticuerpos humanos específicos,  
**caracterizado porque** con antígenos específicos se criban bibliotecas de anticuerpos humanos producidas según la reivindicación 1 ó 2.

