



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

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

⑤① Int. Cl.⁷: **C12N 15/13**
C12P 21/08
C12Q 1/68
G01N 33/53

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **91101095 .7**
⑧⑥ Fecha de presentación: **28.01.1991**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0440147**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.1991**

⑤④ Título: **Producción y utilización de bancos de genes de anticuerpos humanos** (“bibliotecas de anticuerpos humanos”).

③⑩ Prioridad: **01.02.1990 DE 40 02 898**
09.02.1990 DE 40 03 881

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2005

⑦③ Titular/es: **Dade Behring Marburg GmbH**
Postfach 11 49
35001 Marburg, DE

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

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 225 816 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción y utilización de bancos de genes de anticuerpos humanos (“bibliotecas de anticuerpos humanos”).

5 El invento se refiere a la producción y la utilización de bancos de genes de anticuerpos (AK) humanos. Partiendo de una mezcla de linfocitos B humanos, su ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se traduce en un ADNc (ácido desoxirribo-nucleico complementario) mediante utilización de cebadores oligo-DT. A continuación, tiene lugar una amplificación del ADNc específico para AK mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de Polymerase Chain Reaction) mediante empleo de apropiadas secuencias de cebadores oligonucleótidos. Mediante expresión de
10 este ADNc amplificado, específico para AK, en un vector bacteriano de expresión, p.ej. el vector pFMT descrito seguidamente, en el seno de *E. coli*, está a disposición por consiguiente una biblioteca de anticuerpos humanos con un repertorio amplio para el escrutinio (de “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 diferentes anticuerpos. Este número de anticuerpos es suficiente como para provocar una reacción inmunitaria del cuerpo, tanto contra la totalidad de los antígenos presentes en la naturaleza, como también contra antígenos artificiales. Si además se toma en consideración el hecho de que, con frecuencia, varios anticuerpos reaccionan con el mismo antígeno, el repertorio de anticuerpos realmente diferentes ha de establecerse más bien en el intervalo 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 (esplenocitos) *in vitro* con este antígeno. En el caso de anticuerpos policlonales, se pueden aislar a continuación las inmunoglobulinas a partir del suero, y se pueden obtener a partir de ellas los anticuerpos específicos, p.ej. por procedimientos de absorción. Los anticuerpos monoclonales se aíslan a partir de los materiales sobrenadantes celulares o a partir del material lisado
25 de células de tumor de bazo (células de hibridoma) clonadas, que están fusionadas con linfocitos B individuales. Los procedimientos antes expuestos no son apropiados en particular para la producción de anticuerpos humanos específicos o de anticuerpos monoclonales humanos.

30 El presente invento se estableció, 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 inmunoglobulinas humanas. 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 tradujo en un ADNc. Una amplificación específica de la población de los ADNc's de anticuerpos dentro de la agrupación obtenida de ADNc's, se consiguió mediante la utilización de la PCR. Para esto, se utilizaron determinados “cebadores” oligo-nucleótidos, que son homólogos con respecto a secuencias conservadas en ambos extremos del ADNc de anticuerpos (véanse más adelante y los Ejemplos). La concepción de los cebadores para la reacción hacia atrás, con el fin de realizar la síntesis de la cadena no codificadora del ADN de la cadena pesada, se basa en secuencias de IgM (subclase
40 III, puesto que ésta abarca la mayor parte de las secuencias de IgM). Las moléculas de IgM están representadas 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 de ello el peligro de que una IgG o unas pocas IgG's, expresadas de manera especialmente intensa, dominasen en la biblioteca.

45 Hasta 30 rondas de amplificación se llevaron a cabo de una manera conveniente. Los cebadores (“primer”) oligo-nucleótidos contienen apropiados sitios de restricción, con el fin de insertar el ADN amplificado, p.ej. en el plásmido de expresión de anticuerpos pFMT (véase más adelante). Este plásmido de expresión hace posible la expresión de un 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 la parte variable 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 son separadas al realizar la secreción de una enzima bacteriana. Durante la secreción de los productos del ADNc de anticuerpo, se asocian las cadenas ligera y pesada 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 (construcciones) 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).

50 La amplificación de ADN's, que codifican 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, el ARNm procedente de células de hibridoma o de linfocitos de bazo, que entre otras cosas codifica también anticuerpos, se aisló *después* del tratamiento con un antígeno determinado. Por lo tanto, allí se emplearon también secuencias de cebadores, que se basan solamente en secuencias de IgG. Esto naturalmente presenta ventajas allí donde se busca el mayor número que sea 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 los ADN que codifiquen anticuerpos contra el antígeno inyectado. Hay que añadir
65

a esto el hecho de que en los precedentes trabajos se sintetizaron ADN de anticuerpos murinos, y por lo tanto, por consiguiente, no humanos, y adicionalmente se amplificaba mediando exclusión de zonas de la cadena lambda.

En el presente invento pasan a emplearse por el contrario secuencias de cebadores, que son homólogas con respecto a secuencias existentes en los dominios constantes de ADNc de IgM. Así, el invento 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 escrutinio de clones bacterianos con el antígeno elegido.

En la Tabla 1 se recopilan apropiados cebadores oligonucleótidos para la amplificación. Las posiciones de los cebadores antes mencionados en las cadenas μ , kappa y lambda se representan esquemáticamente en la Tabla 2. Las construcciones biológicas 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.

El invento se refiere, como consecuencia de ello, a bibliotecas de anticuerpos humanos, que se producen por medio de una transcripción del ARNm procedente de linfocitos B humanos (periféricos) no activados, mediante cebadores oligo-dT, de una subsiguiente amplificación por una PCR mediando utilización de cebadores que contienen secuencias que son homólogas con respecto a zonas conservadas de un ADNc de IgM, y de una subsiguiente incorporación en apropiados plásmidos de expresión con el fin de realizar la expresión en microorganismos, de modo preferido 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 un péptido marcador, p.ej. 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, el invento comprende la utilización de las precedentes 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, por escrutinio con antígenos seleccionados, así como procedimientos para el aislamiento de los mencionados anticuerpos humanos o sus partes que se fijan a antígenos, y también procedimientos para la producción de las mencionadas bibliotecas de anticuerpos humanos.

El invento comprende además vectores de expresión con las propiedades del plásmido de expresión de anticuerpos pFMT.

Los siguientes Ejemplos ejecutan el invento de manera adicional, pero sin limitarlo. Finalmente, el invento está contenido en las reivindicaciones de esta patente.

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 anticuerpo, el plásmido se cortó con SalI y BamHI, los extremos se rellenaron con la polimerasa de Klenow y se ligaron. De este modo, se eliminaron estos sitios de restricción y el ADN situado entre medias. Además, el plásmido se disoció con HindIII, los extremos se rellenaron con la polimerasa de Klenow y se ligaron con engarzadores de BamHI. Mediante esta operación se eliminó el sitio de restricción con HindIII y se insertó un sitio para BamHI. En este plásmido modificado se insertó el ADN de anticuerpo. Una vía esquemática de construcción de anticuerpo, que codifica 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 peptidato 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 (P₁ delante de la cadena pesada) y la secuencia para un segundo sitio de fijación a ribosomas (RBS) y una segunda secuencia de guía (P₂ delante de la cadena pesada) se sintetizaron a partir de varios oligonucleótidos (Tabla 4).

Los ADNc's de anticuerpos, que codifican regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo humano (HuVhlys o bien HuVllys; Riechmann y colaboradores, (1988) J. Mol. Biol. 203, 825), se obtuvieron del Dr. G. Winter (Cambridge, Reino Unido). Los sitios de restricción con HindIII (HuVhlys) y con EcoRV (HuVllys) se introdujeron, con el fin de hacer posible la inserción del ADNc de anticuerpo en el vector de expresión. Otros sitios de restricción para BanII (HuVhlys) y para BstEII o bien KpnI (HuVllys) se introdujeron con el fin de 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

ES 2 225 816 T3

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 anticuerpo acabado se muestra en la Tabla 5.

5 Para la inserción de la secuencia de guía P₁ (Tabla 4), el plásmido modificado pKK233-2 se digirió con las enzimas de restricción NcoI y PstI y la P₁ se insertó entre estos sitios (pKK233-2-P₁). 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 anticuerpo en el vector de expresión perjudica al crecimiento del anfitrión bacteriano.

10 Antes de la clonación en pUC18 se tuvo que eliminar el sitio de restricción con BamHI de éste. 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 HindII, y se introdujeron y ligaron el P₂ más el RBS entre estos sitios de restricción (pUC18-P₂). En el caso de esta operación desaparece el sitio original de restricción con HindIII del plásmido y se incorpora un nuevo sitio de restricción con HindII. El pUC18-P₂ se digirió luego con PstI e HindIII, y el ADN de la cadena pesada (inserto de PstI-HindIII procedente de M13) se ligó en estos dos sitios (pUC18-HP₂). Este plásmido se digirió luego con EcoRV y BamHI, y el ADN de la cadena ligera (inserto de EcoRV-BamHI procedente de M13) se ligó allí dentro (pUC18-HP₂L).

15 En una preferida forma de realización, en el nuevo sitio de corte con HindIII se introdujo y ligó una secuencia “TAG” (Tabla 4). La secuencia “TAG” codifica el péptido Glu-Glu-Gly-Glu-Glu-Phe y es reconocido por el anticuerpo monoclonal YL 1/2 (Wehland y colaboradores (1984) EMBO J. 3, 1295). El plásmido resultante es el pUC-HTP₂L.

20 Para la inserción del HP₂L y respectivamente del HTP₂L en el vector de expresión, los pUC18-HP₂L y respectivamente pUC-HTP₂L se cortaron con PstI y BamHI, y el correspondiente fragmento de restricción se ligó en cada caso en el plásmido modificado pKK233-2-P₁ 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 un ARN a partir de linfocitos B humanos

30 Para el enriquecimiento de 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 interfase 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 material plástico (frasco de cultivo). Las células adherentes (monocitos y macrófagos) se adhieren al recipiente de cultivo y de esta manera se pudieron eliminar desde 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 xg. El ARN sedimentado se disolvió en H₂O bidestilada y se precipitó durante una noche a -20°C con etanol al 70% y 1/20 volúmenes de LiCl 8 M.

40 Con el fin de obtener una multiplicidad 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

50 El ARNm se purificó a través de oligo-dT-Sepharose (estuche (kit) de Pharmacia) y se tradujo con una transcriptasa inversa (estuche de Amersham) y un cebador oligo-dT en un ADNc. Los productos se utilizaron directamente en la “reacción en cadena de la polimerasa” (de “polymerase chain reactor” = PCR). Los cebadores de PCR y los sitios de hibridación se muestran en las Tablas 1 y respectivamente 2. Mediante una combinación del ADN μ 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 todavía adicionalmente un dominio constante (similar al fragmento Fab de un anticuerpo). Para efectuar la PCR se hicieron reaccionar 4 μ l de una tanda de síntesis de ADNc en cada caso con 0,2 nmol de los dos cebadores en un volumen de 50 μ l. La tanda de reacción contenía 100 mM de KCl, 0,1% de gelatina y 2,5 U de polimerasa de 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.

Ejemplo 4

Inserción del ADN de anticuerpo en el plásmido de expresión

65 El ADN precipitado se separó en un tampón de carga para geles de agarosa [(0,1% de azul de bromofenol, 7% de Ficoll® [Pharmacia]) y se separó a través de 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 con ayuda de su peso molecular y se

ES 2 225 816 T3

eluyó a partir del gel. Después de una precipitación con etanol, éste se recogió en un tampón para la respectiva enzima de restricción y se cortó con las correspondientes enzimas de restricción (de Boehringer Mannheim) (compárense las Tablas 1 y 2). Después de una precipitación en etanol, éste se incorporó y ligó en el vector pFMT asimismo cortado, tal como se muestra esquemáticamente en la Tabla 7.

5

Ejemplo 5

Expresión y escrutinio de anticuerpos en E. coli

10 Células de *E. coli* competentes se transfectan con plásmidos pFMT, que contienen la biblioteca de ADN de anticuerpos que se ha insertado, 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 contra 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".

15

Leyenda acerca de la Figura 1

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

20

P_{trc} significa un promotor híbrido de triptófano y lac

RBS significa un sitio de fijación a ribosomas

25

rrnB significa un ARN B ribosomal (ARN de 5S)

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

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

30

1) Los sitios de restricción con Sall y EcoRI se eliminaron conjuntamente con el ADN situado entre medias.

2) El sitio de restricción con HindIII se transformó en un sitio de restricción con BamHI.

35

TABLA 1

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

40

1. Cebadores oligonucleótidos para la PCR hacia adelante

D. Cadena μ

45

GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTT

Pst I

E. Cadena κ

50

TGTCTGCATCTGT(A/G)GGAGACAGGGTCCACCATCA(A/C)TTG

Bst E II

F. Cadena λ

55

CCTCAG(C/T)GTCTGGG(A/T)CCCCAGGACAGAGGGTGGACCATCTCCTGC

Bst E II

60

65

ES 2 225 816 T3

2. Cebadores oligonucleótidos para la PCR hacia atrás (dominio variable más dominio constante colindante)

5 A1. Cadena μ (sin secuencias "TAG")

GGGTGGGACGAAGA ^{Hind III} AAGCTTACTTAGGGAGGCAGCTCAGCAATCAC

10 A2. Cadena μ (con secuencias "TAG")

GGGTGGGACGAAGAAGCTA ^{Hind III} AAGCTTGGGAGGCAGCTCAGCAATCAC

15 B. Cadena κ

GGCACTTC ^{Bam H I} GGATCCTAACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGA
20 GCTCAGGCC

C. Cadena λ

25 GTGAGGG(A/T)T ^{Bam H I} GGATCCTATGAACATTCTGTAGGGGCCACTGT

30 3. Cebadores oligonucleótidos para la PCR hacia atrás (dominio variable)

35 G1. Cadena μ (sin secuencias "TAG")

CACAGGAGACGAGGGGGAA ^{Hind III} AAGCTTTGGGGCTTATGCACTCCC

40 G2. Cadena μ (con secuencias "TAG")

CACAGGAGACGAGGGGGAA ^{Hind III} AAGCTTTGGGGCGGATGCACTCCC

45 H. Cadena κ

AACAGAGGC ^{Bam H I} GGATCCCTCATTTCAACTGCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAA
50 GAC

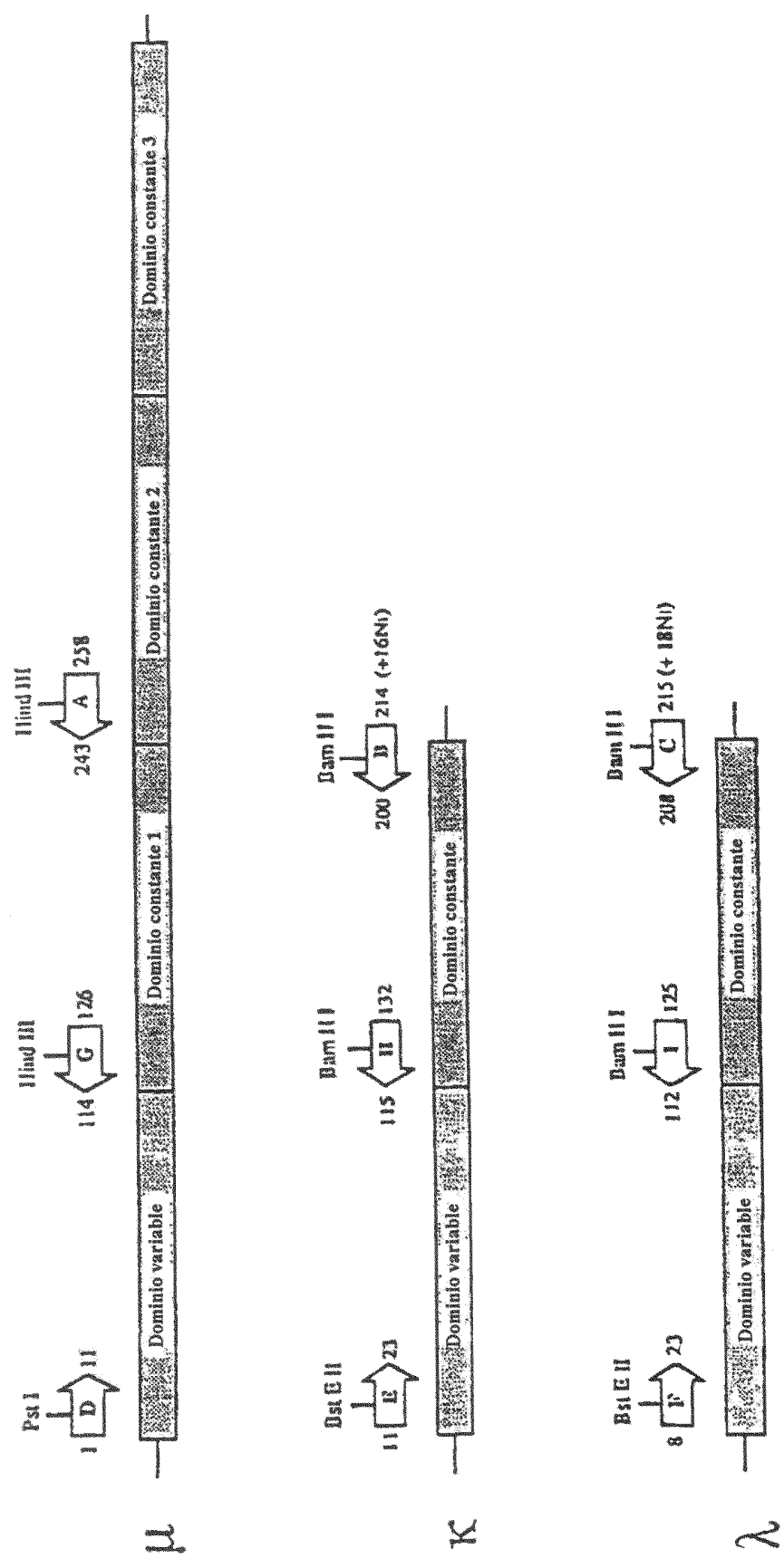
I. Cadena λ

55 AGCTCCTCAGAGGA(C/G)GG ^{Bam H I} GGATCCGAGTGACCTAGGGG

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

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
SECRECIÓN 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 PEPTATO 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.

ES 2 225 816 T3

TABLA 4

Secuencias de las secuencias de guía P1 y P2 en el operón de anticuerpo así como las secuencias "TAG"

5

P1

Secuencia de guía de la peptidasa (P1)

10

M K Y L L P T A A A G L L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q
 CATGAAATACCTCTTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCCTGCTGCTGCCAGCTCAGCCGGCGATGCCCAAGTTCAGCTTGG (G)
PstI

15

P2

Secuencia de guía de la peptidasa (P2)

20

RBS

M K Y L L P T A A A

(C)TTCGCCCAGCGTGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTACTCCATGAAGTACTTACTGCCGACCGCTGGGGC
PstI HindIII

G L L L L A A Q P A M A D I
 GGCTCCCTGGTGTGGGGCTCAGCCGCTATGCTTGAATTCAGCTTGGGATTCAGCT
EcoRV BamHI

25

Los nucleótidos puestos entre paréntesis son los nucleótidos colindantes del plásmido.

30

Las secuencias de guía se sintetizaron por medio de la hibridación de los siguientes oligonucleótidos

P1

35

- a. 5' CATGAAATACCTCTTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTG3'
- b. 3' TTTATGGGGAACGGATGCCGCTGGCCGACCGAACGACGACCCCTCGAGTCGGCCGCTACCGCTTCAAGTCG5'
- c. 5' CTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCGATGCCCAAGTTCAGCTGCA3'

P2

40

- a. 5' GCCAAGCTTGAATTCATTAAAGAGGAGAA3'
- b. 5' TTAATCCATGAAGTACTTACTGCCGACCGCTGCG3'
- c. 3' ACGTCGGTTCCGAACCTAAGTAATTTCTCCTCTTTAATTGAGTACTTCATGAATGACGGCTGGCCGACCGCCGCCCAGAGGACGACACCCGCCGAGTCGGCCGATACCGACTATAGCCTAGGTCCA5'
- d. 5' GCTCAGCCGGCTATGGCTGATATCGGATCC3'
- e. 5' GCCGGTCTCCTGCTGTGGCG3'

50

Las secuencias "TAG" se sintetizaron mediante la hibridación de las siguientes secuencias:

55

- a. 5' AGCTTGAAGAAGGTGAAGAATTCATAATG3'
- b. 5' AGCTCATGAAATTCCTCACCTTCTCA3'

60

65

ES 2 225 816 T3

TABLA 5

Secuencias de nucleótidos de un ADN de anticuerpo

a) cadena pesada (dominio variable) HuVhlys

5
G V E S Q V Q L Q E S G P G L V R.
 10 CTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCTCACTGCAGGAGAGCGGTCCAGGTCTTGTGAGA
 HindIII.....
 1
 10
G V E S Q V Q L Q E S G P G L V R.
 10 CTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCTCACTGCAGGAGAGCGGTCCAGGTCTTGTGAGA
 PstI
 20
 30 CDR1
 P S Q T L S I T C T V S G F T F S V/G/I/Y/G/
 15 CCTAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGTCTGGCTTCACCTTCAGCGGCTATGGT
 BspMI
 40
 50
N/N/ W V R Q P P G R G L E W I G M/I/W/G/
 20 GTAAACTGGGTGAGACAGCCACCTGGACGAGGCTTGCAGTGGATTGGAATGATTGGGGT
 CDR2 60 70
D/G/N/T/D/Y/H/S/A/L/K/S R V T H L V D T
 25 GATGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGAGTGACAATGCTGGTAGACACC
 80 90
 S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y
 30 AGCAGAACCCAGTTCAGCCTGAGACTCAGCAGCGTGACAGCCGCCGACACCCGCGGTCTAT
 SscII
 100 CDR3 110
 Y C A R E/R/D/Y/R/L/D/Y W G Q G S L V T
 30 TATTGTGCAAGAGAGAGATTATAGGCTTGCCTACTGGGGTCAGGGCTCCCTCGTCACA
 BspII
 V S S Stop
 35 GTCTCCTCATGAGCTTCCTTACAACCTCTCTCTTCTATTCAAGCTTAA..... BamHI
 HindIII

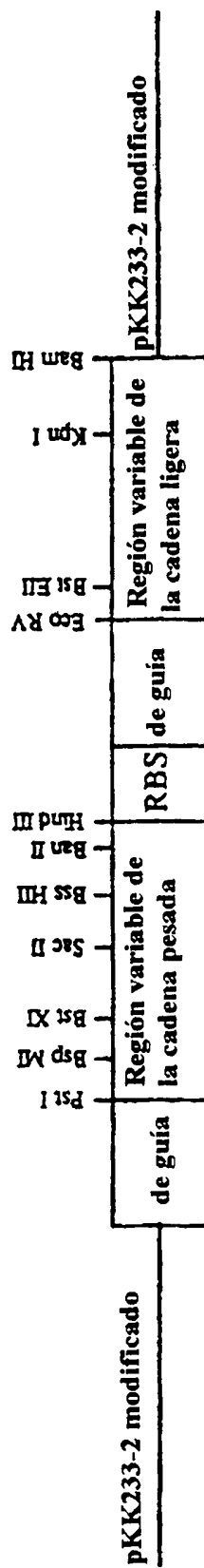
b) cadena ligera (dominio variable) HuVllys

40
G V E S D I Q N T Q S P S S L S A.
 45 CTCTCCACAGGTGTCCACTCCGATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCC
 EcoRV
 20
 30 CDR1 30
 S V G D R V T I T C R/A/S/G/N/I/E/N/Y/L
 45 AGCGTGGGTGACAGGGTGCACATCACCTGTAGAGCCAGCGGTAACATCCACAACACTACCTG
 BstEII
 40
 50 CDR2
A/ W Y Q Q K P G R A P K L L I Y Y/F/T/T/F
 50 GCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTACACCACCACC
 60
 70
L/A/D/ G V P S R F S G S G S G T D F T F
 55 CTGGCTGACGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTTC
 80 90 CDR3
 T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q/E/F/W/S/
 60 ACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCACTTCTGGAGC
 100
T/P/R/T/ F G Q G T K V E I K R. E Stop
 65 ACCCCAGGGACGTTCCGGCCAGGTACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAGTAGAATTTAAAC
 KpnI
 TTTGCTTCCTCAGTTGGATCC
 BamHI

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

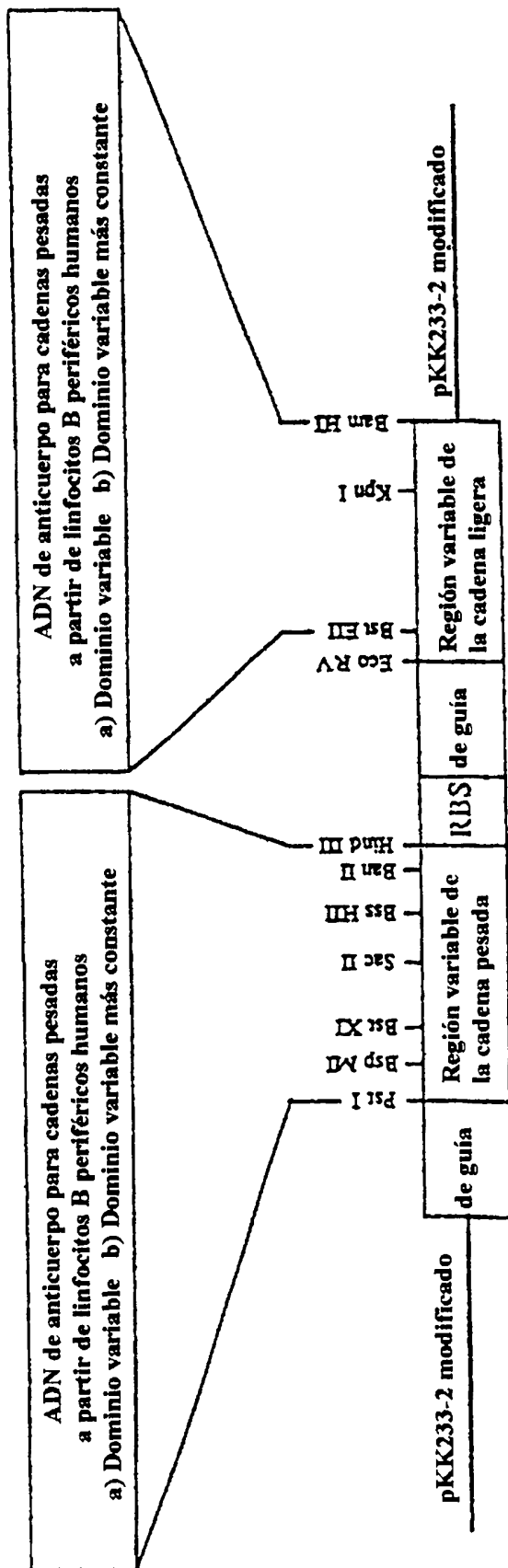
Tabla 6

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 un
ARNm a partir de linfocitos B humanos periféricos no activados y se transcribe en un ADNc, a continuación el ADNc
que codifica los anticuerpos se amplifica por una PCR mediante cebadores apropiados, a continuación de ello se lleva
a cabo una incorporación en apropiados plásmidos de expresión, y finalmente se efectúa una expresión del ADNc de
10 anticuerpos en clones individuales, y porque mediante los cebadores utilizados se amplifican en cada caso solamente
las regiones variables, que no codifican plásmidos de expresión para ningún dominio constante de un anticuerpo y
porque la concepción de los cebadores utilizados para la reacción hacia atrás, con el fin de sintetizar la cadena no
codificadora de la cadena pesada, se basa en secuencias de IgM.

15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la expresión se efectúa en el plásmido
pFMT de acuerdo con la Tabla 6.

3. Procedimiento para el aislamiento de anticuerpos humanos específicos **caracterizado** porque con antígenos
específicos se escrutan bibliotecas de anticuerpos humanos producidas de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

