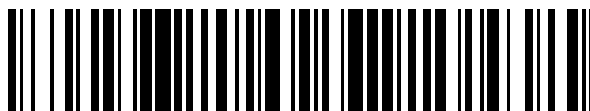


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 548**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2011 PCT/EP2011/070473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12066129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2011 E 11785411 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2640742**

54 Título: **Una colección de secuencias de anticuerpos y su uso**

30 Prioridad:

**19.11.2010 EP 10191910**

**19.11.2010 US 415367 P**

**08.06.2011 US 201161494452 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.01.2019**

73 Titular/es:

**MORPHOSYS AG (100.0%)**

**Lena-Christ-Strasse 48**

**82152 Planegg-Martinsried, DE**

72 Inventor/es:

**URLINGER, STEFANIE;**

**TILLER, THOMAS;**

**SCHUSTER, INGRID y**

**STARK, YVONNE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 696 548 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

Una colección de secuencias de anticuerpos y su uso

## REFERENCIA CRUZADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 61/494.452 presentada el 8 de junio de 2011, y la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 61/415.367 presentada el 19 de noviembre de 2010, las cuales se incorporan ambas como referencia en su totalidad.

## LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene una Lista de Secuencias que se ha presentado en formato ASCII a través de EFS-Web y se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 15 de febrero de 2011, se denomina MS130US.txt y tiene 229.568 bytes de tamaño.

## ANTECEDENTES

Los avances en el desarrollo farmacéutico, especialmente en el campo de los anticuerpos terapéuticos, están permitiendo y/o mejorando rápidamente el tratamiento de muchas enfermedades. Estos avances con los que se alcanzan nuevas áreas como meta y proporcionan nuevos mecanismos de acción, están mejorando cada vez más la calidad de vida de pacientes, incluso con las enfermedades más graves y problemáticas. Uno de los retos del sistema de atención sanitaria en general y de los pacientes en particular, es que los costes de nuevos fármacos, facilitados por estos avances farmacéuticos, también se incrementan rápidamente. Los costes elevados son el resultado de las inversiones necesarias para el desarrollo de productos farmacéuticos, especialmente de anticuerpos, que actualmente superan los mil millones de dólares por producto comercializado. El alto riesgo de fracaso en el desarrollo y los plazos de desarrollo muy largos hacen que estas inversiones sean inevitables. Puede durar más de quince años desde el momento de la identificación de un anticuerpo terapéutico potencial hasta que llega al mercado y puede beneficiar a los pacientes. Cada etapa del desarrollo, desde la identificación, la preclínica, la clínica hasta su introducción en el mercado, está plagada de desafíos y riesgos. Las compañías farmacéuticas están haciendo cálculos constantemente para determinar cómo reducir los costes del desarrollo mediante la reducción de plazos y los riesgos de fracaso, con el fin de obtener los medicamentos más eficaces para ponerlos a disposición de pacientes de forma rápida.

La siguiente descripción proporciona un avance considerable que permite una identificación más rápida de los anticuerpos terapéuticos óptimos para el tratamiento de cualquier enfermedad. Los candidatos para anticuerpos terapéuticos deben cumplir una serie de criterios de desarrollo con el fin de llegar al mercado, como por ejemplo, una estabilidad a largo plazo, una tendencia baja a la agregación y rendimientos elevados de la expresión. El avance descrito incrementa la probabilidad y la velocidad para identificar un anticuerpo que puede cumplir con todos los criterios de desarrollo rigurosos, exactamente desde el principio. El anticuerpo resultante será menos costoso de producir y será eficaz y seguro en el tratamiento de numerosas enfermedades.

Un método bien conocido para la identificación de anticuerpos terapéuticos es a través del uso de tecnología de presentación en fagos. La presentación en fagos utiliza partículas similares a virus que se cultivan en bacterias para presentar anticuerpos. Una ventaja de esta tecnología es que las genotecas usadas son enormes, con hasta  $1 \times 10^{11}$  anticuerpos, en las que rápidamente se puede someter a ensayo la unión a cualquier diana relevante para cualquier enfermedad. Véase, por ejemplo, Knappik et al., (2000), "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides," J. Mol. Biol. 11; 296(1):57-86, y el documento de patente de EE.UU. número 6.300.064, ambos incorporados como referencia en su totalidad. El beneficio de trabajar con una cantidad tan grande es que el resultado de un escrutinio en busca de una diana puede dar como resultado cientos de anticuerpos que se unen a la diana terapéutica, pudiendo ser todos ellos terapéuticamente relevantes. Un problema, sin embargo, es que frecuentemente solo unos pocos de estos anticuerpos se pueden desarrollar, es decir, pueden satisfacer todos los criterios rigurosos requeridos con el fin de que lleguen al mercado.

Para que en una nueva colección de presentación en fagos disminuyan rápidamente los tiempos de identificación y se reduzcan los riesgos inherentes, la colección debería comprender anticuerpos con propiedades que son necesarias para la selección y el desarrollo clínico y que darán como resultado un tratamiento seguro y eficaz en los pacientes. Tales propiedades incluyen: 1) tasas de presentación en fagos elevadas, de modo que todos y cada uno de los anticuerpos de la colección se pueden someter a ensayo frente a la diana de interés; 2) niveles de expresión elevados en ambos formatos Fab e IgG1, de manera que el anticuerpo o un fragmento se pueden reproducir de manera eficaz en la cantidad necesaria; 3) estabilidad térmica elevada en ambos formatos Fab e IgG1, para asegurar una integridad estructural y funcional de las moléculas administradas a los pacientes; 4) estabilidad en suero elevada en ambos formatos Fab e IgG1, de manera que el anticuerpo muestra una semivida incrementada y una actividad prolongada; 5) alto contenido monomérico (% de monómero) como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en ambos formatos Fab e IgG1, ya que esto significa una baja propensión a la agregación; 6) punto isoelectrico (pi) elevado en el formato IgG1; 7) estabilidad térmica elevada en los formatos Fab e IgG1 antes y des-

pués de la exposición a un ácido; 8) baja turbidez en los formatos Fab o IgG1 antes y después de la exposición a un ácido; 9) radio molecular y % de polidispersidad estables antes y después de la exposición a ácido; 10) bajo riesgo de inmunogenicidad, lo que aumenta la seguridad, y/o 11) una gran diversidad, de modo que una colección se puede utilizar para identificar muchos anticuerpos contra cualquier diana terapéutica.

Una colección, que de manera esencial imita al sistema inmune humano, debería ser muy valiosa o incluso la solución óptima. El sistema inmune humano está compuesto por anticuerpos codificados por genes de la línea germinal. Los anticuerpos comprenden, en parte, una cadena pesada variable y cadenas ligeras variables. Hay aproximadamente 50 genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y aproximadamente 50 genes de la línea germinal de la cadena ligera variable, proporcionando de forma combinada aproximadamente 2500 combinaciones de parejas diferentes de cadena pesada y ligera variable. En los seres humanos, se cree que se producen todas las 2500 combinaciones. Sin embargo, se ha descubierto, que ciertas cadenas pesadas variables, ciertas cadenas ligeras variables y/o combinaciones (parejas) de cadenas pesadas y ligeras variables, están presentes a un nivel más elevado que otras. Se planteó la hipótesis de que debía haber alguna razón por la que algunas están más presentes que otras y, si era así, los genes de la línea germinal más presentes pueden tener propiedades funcionales favorables. Por lo tanto, una forma de proporcionar una colección de anticuerpos que tengan propiedades funcionales favorables, es generar una colección que comprenda la cadena pesada variable, la cadena ligera variable y/o las parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable abundantes presentes en el repertorio inmune humano.

Además, se cree que las secuencias de genes de la línea germinal presentes en los seres humanos tienen una inmunogenicidad muy baja, por razones obvias, por lo tanto esas secuencias se pueden imitar en anticuerpos recombinantes con el fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad.

Se han llevado a cabo estrategias para evaluar los emparejamientos de genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera variable, prevalentes en el repertorio inmune humano. Véase, de Wildt et al., Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire, J Mol Biol. 22; 285(3):895-901 (enero de 1999), que se incorpora como referencia en su totalidad. Wildt et al. tomaron muestras de sangre procedentes de donantes humanos, clasificaron los linfocitos B + IgG que se habían sometido a hipermutación somática, amplificaron mediante PCR los ADNc, secuenciaron cada ADNc y alinearon cada secuencia con los genes conocidos de la línea germinal del dominio variable humano. Wildt et al. observaron que solo unos pocos genes de la línea germinal dominaban el repertorio inmune y que los segmentos de genes de la cadena pesada y ligera frecuentes, se emparejan con frecuencia.

También se han llevado a cabo intentos de mantener los emparejamientos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de linfocitos B individuales. Por ejemplo, se han descrito genotecas de "parejas análogas" de dominio variable. Véase Meijer et al., Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing, J Mol Biol., 358(3):764-72 (5 de Mayo 2006); y el documento WO2005042774, que se incorporan ambos como referencia en su totalidad. Genotecas de acuerdo con las técnicas descritas en Meijer et al. se han generado a partir de linfocitos B individuales procedentes de un hospedador inmunizado. Generalmente, los linfocitos B están clasificados mediante FACS de modo que se seleccionan los linfocitos B CD38<sup>HI</sup>, que representan células hipermutadas somáticamente, sus ADNc se amplifican por PCR, y los productos génicos de anticuerpos se insertan en vectores Fab para una selección. Tales genotecas de parejas análogas no dejan de tener sus limitaciones. Por ejemplo, los hospedadores que proporcionan los linfocitos B, típicamente están inmunizados; y las poblaciones de linfocitos B clasificadas se han hipermutado, por lo tanto, las genotecas resultantes están sesgadas frente a un inmunógeno particular.

Además, se han llevado a cabo intentos de utilizar una cadena pesada variable o cadenas ligeras variables destacadas para generar una colección. Por ejemplo, en Shi et al., "De Novo Selection of High-Affinity Antibodies from Synthetic Fab Libraries Displayed on Phage as pIX Fusion Proteins"; J Mol Biol., 397(2):385-96 (26 de marzo de 2010) y el documento de la solicitud de patente respectiva WO2009085462; y WO2006014498, que se incorporan como referencias en su totalidad. Aquí, las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable se incorporaron en genotecas basándose en su frecuencia de uso en el repertorio inmune humano.

También se han llevado a cabo intentos adicionales, que incorporan una pareja específica de la línea germinal en una colección. Por ejemplo, el documento WO1999020749, que se incorpora como referencia en su totalidad, describe una colección en la que sus miembros comprenden cadenas pesadas que tienen la estructura canónica de un bucle hipervariable codificado por el segmento génico de la cadena pesada de la línea germinal humana DP-47 (IGHV3-23) y/o regiones estructurales codificadas por el gen de la línea germinal, y/o cadenas ligeras que tienen la estructura canónica de un bucle hipervariable codificado por el segmento génico de la cadena ligera de la línea germinal humana O2/O12 (IGKV1-39/1 D-39) y/o regiones estructurales codificadas por el gen de la línea germinal.

Otras metodologías han generado genotecas directamente a partir de linfocitos B o derivadas de los mismos. Por ejemplo, en Glanville et al., Precise Determination of the Diversity of a Combinatorial Antibody Library Gives Insight into the Human Immunoglobulin Repertoire, Proc Natl Acad Sci 1; 106(48):20216-21 (diciembre de 2009), que se incorpora como referencia en su totalidad, se describe una colección de anticuerpos construida a partir de la diversi-

dad de repertorios de inmunoglobulina M (IgM) de 654 donantes humanos. Específicamente, los ADNc del gen V de la cadena pesada y ligera procedentes de 654 donantes humanos, se amplificaron por separado mediante PCR (separando la pareja de la cadena pesada y ligera variable) y los dominios de la cadena pesada y ligera se reasociaron a continuación aleatoriamente. El documento WO2003052416, que se incorpora como referencia en su totalidad, describe también el aislamiento de linfocitos B a partir de un hospedador que muestra una respuesta pronunciada frente a un agente patógeno de interés, ya sea como resultado de una infección con un microorganismo o del tratamiento con una vacuna. En el documento WO2003052416, el ADNc que codifica la región CDR3 de las regiones variables se secuenció y se diseñaron fragmentos de anticuerpos que comprendían las CDR3s dominantes. El documento WO2009100896, que se incorpora como referencia en su totalidad, describe el aislamiento de linfocitos B a partir de un hospedador inmunizado, en donde se secuenciaron los ADNc que codificaban las regiones de la cadena pesada y ligera variable y se determinó la abundancia de las secuencias de la cadena pesada variable y ligera variable sin emparejar. En el documento WO2009100896 se sintetizaron genotecas que comprendían las cadenas ligeras variables y pesadas y variables, recombinadas aleatoriamente, en donde los anticuerpos eran específicos de un inmunógeno. Un resumen de estas metodologías y de otras adicionales se encuentra en Fuh et al., Synthetic antibodies as therapeutics, Expert Opin Biol Ther. 7(1):73-87 (enero de 2007), que se incorpora como referencia en su totalidad.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de una colección de anticuerpos o de fragmentos de los mismos que incorpore las parejas de genes de la cadena pesada variable y ligera variable, presentes en el repertorio inmune humano que tienen propiedades biofísicas favorables, relevantes para el desarrollo, excluyendo al mismo tiempo las parejas que existen en la naturaleza pero que no tienen esas propiedades biofísicas. Estas y otras necesidades se satisfacen por medio de la presente invención.

#### COMPENDIO

La presente descripción proporciona una solución valiosa para el problema de identificar de manera eficaz anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra cualquier antígeno, que se puedan desarrollar y sean seguros y eficaces en los pacientes. En su sentido más general, los inventores comenzaron con la idea de que una colección de anticuerpos que imita el sistema inmune humano de forma esencial, puede ser ventajosa. Por un lado, los inventores decidieron imitar el sistema inmune humano incorporando en anticuerpos las secuencias óptimas de genes de la línea germinal o porciones de las mismas, procedentes del repertorio inmune humano. Para ello, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la colección comprenden porciones, por ejemplo, regiones estructurales que son por la secuencia de la línea germinal. Empleando las secuencias de la línea germinal, el riesgo de inmunogenicidad de los anticuerpos recombinantes para uso terapéutico en pacientes debería disminuir radicalmente.

Además, los inventores trabajaron basándose en su hipótesis de que las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, abundantes en el repertorio inmune humano, tienen probablemente propiedades biofísicas favorables que conducirían a un desarrollo clínico más eficaz y aumentarían la seguridad y la eficacia de los anticuerpos resultantes en los pacientes. Como antecedente, cada linfocito B codifica un anticuerpo, y cada anticuerpo comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable. Cada cadena pesada variable y cada cadena ligera variable de un anticuerpo se puede alinear con secuencias de la línea germinal con el fin de determinar el origen del anticuerpo, es decir, a partir de qué gen de la línea germinal se ha codificado la cadena pesada variable y la cadena ligera variable. Por lo tanto, para cada anticuerpo, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden una pareja de genes de la línea germinal o una pareja de proteínas de la línea germinal, por ejemplo, VH3-23 se empareja con VK1-5.

Con el fin de comprobar la hipótesis de que las parejas de genes destacadas de la línea germinal tienen probablemente propiedades biofísicas favorables, la primera etapa fue identificar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, prominentes en el repertorio inmune humano. Esto se hizo investigando exhaustivamente las publicaciones disponibles públicamente y mediante el muestreo de linfocitos B procedentes de un hospedador humano. Como siguiente etapa, estos datos se agruparon, se analizaron y las parejas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano, se clasificaron en función de su incidencia. A partir de esos datos era evidente que ciertas parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable estaban presentes con mayor frecuencia que otras en el repertorio inmune humano.

Como etapa siguiente, había que determinar qué parejas de proteínas de la línea germinal se iban a someter a ensayo para estudiar las propiedades funcionales relevantes para el desarrollo, ya que existen ~2500 parejas en el repertorio inmune humano, se prefiere no someter a ensayo cada una. Una forma sería someter a ensayo las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que aparecen con más prominencia en el repertorio inmune humano, por ejemplo, véase la Tabla 6. Se podrían seleccionar, por ejemplo, las mejores cuatrocientos parejas para las pruebas o seleccionar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en cierta cantidad umbral o por encima de cierto umbral. Esta metodología requeriría la síntesis y someter a ensayo un número muy grande de secuencias de parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable; por lo tanto, esta metodología puede no ser muy eficaz.



Como metodología alternativa, los inventores seleccionaron un subconjunto de las parejas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que era representativo, reproducía con precisión o incluía la mayoría de las parejas prominentes procedentes del repertorio inmune humano. Esta metodología se basaba, en parte, en la observación de que un pequeño número de genes (no emparejados) de la línea germinal de la cadena pesada, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable, son dominantes en el repertorio inmune humano. Wildt et al. en las páginas 895-896 describen este fenómeno. Wildt et al. también establecen que los segmentos de genes de la cadena pesada y ligera frecuentes, están emparejados con frecuencia, y observaron que la mitad de los emparejamientos sometidos a ensayo se correspondía solo con cinco parejas de la línea germinal. Por lo tanto, un pequeño número de genes (no emparejados) prominentes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera, se puede combinar para generar un grupo de parejas de la cadena pesada y ligera que son representativas del repertorio inmune humano.

Esta metodología se llevó a cabo de la siguiente manera. Los datos que mostraban las parejas de VH o VL ligadas, véase, por ejemplo, la Tabla 6, y los datos que identifican la presencia de cadenas VH o VL sin ligar, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la Tabla 5, se analizaron para determinar los genes (no emparejados) de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable que eran prominentes en el repertorio inmune humano.

Como siguiente etapa, las secuencias (no emparejadas) de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable se evaluaron para determinar sus propiedades biofísicas relevantes para el desarrollo, véase el Ejemplo 4. Las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable se evaluaron *in silico* para estudiar las siguientes propiedades: (i) la longitud de las CDRs, (ii) el punto isoeléctrico (pI) (el punto isoeléctrico preferido es 7,5 o superior ya que debería proporcionar estabilidad en un tampón de formulación ligeramente ácido), (iii) sitios potenciales para sitios de modificaciones postraduccionales (PTMs) (específicamente, sitios de glicosilación ligados a N (NxS o NxT) o modificaciones químicas tales como la escisión de Asp (frecuentemente en un DP o DQ), (iv) la isomerización de Asp (DD, DG), (v) la desamidación (NS, NG) que puede tener lugar *in vivo* (en suero) o después de un almacenamiento en tampón de formulación y conduce a la pérdida de unión del antígeno), (vi) la presencia de metioninas en las CDRs (pueden tener una tendencia a oxidarse cuando se exponen a un disolvente), (vii) la presencia de cisteínas no apareadas (formarán enlaces disulfuro con cualquier otra cisteína no apareada, lo que conducirá a una reticulación de las proteínas y/o a niveles de expresión más bajos), (viii) desviaciones de la línea germinal, (ix) la presencia de posibles epítomos de linfocitos T, y (x) la tendencia a una agregación teórica.

Como siguiente etapa, las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable que tenían características biofísicas favorables *in silico*, se combinaron para formar parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable. Como se muestra en la Tabla 5 y las Figuras 2-3, en general, se seleccionaron las 20 mejores VH, las 8 mejores VL y las 12 mejores VK para la síntesis, la combinación y el análisis funcional subsiguiente. Las secuencias de genes de la línea germinal se sintetizaron y después se combinaron con el fin de generar 400 parejas de proteínas de la línea germinal (20VH X 20VL) que son representativas de reproducir con precisión o incluir la mayoría de las parejas prominentes del repertorio inmune humano, como se muestra en la Tabla 6. Esta se realizó mediante una síntesis de los genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera variables, combinándolos en parejas, expresando las parejas como proteína (parejas de proteínas de la línea germinal) y sometiendo a ensayo cada una para identificar sus propiedades biofísicas. Se analizaron las siguientes propiedades: (i) la tasa de presentación relativa en fagos en el formato Fab, (ii) el nivel de expresión relativa en el formato Fab, por ejemplo, en *E. coli*; (iii) la estabilidad térmica en el formato Fab; (iv) la estabilidad en suero bovino o de ratón en el formato Fab; (v) el nivel de expresión relativa en el formato IgG1; y (vi) la estabilidad en suero bovino en el formato IgG1.

Someter a ensayo las 400 parejas de proteínas de la línea germinal para la presentación, la expresión, la estabilidad térmica y en suero, fue como un filtro preliminar para eliminar las parejas de proteínas de la línea germinal que, a pesar de que existen en la naturaleza, no tienen propiedades biofísicas que se consideran favorables para un desarrollo terapéutico. El objetivo era seleccionar un subgrupo de parejas de proteínas de la línea germinal que tenían características de capacidad de desarrollo favorables, mientras que al mismo tiempo conservaban un alto nivel de diversidad dentro de una colección, de modo que la colección se podía utilizar para identificar candidatos con capacidad de desarrollo contra cualquier antígeno. La Tabla 12 muestra ~60 parejas de proteínas de la línea germinal en negrita y subrayadas que alcanzaban los umbrales de una realización de la descripción. La Tabla 12 se dio a conocer anteriormente en el documento WO2010/136598 (MorphoSys AG), que reivindica el beneficio de 61/182.350 y 61/299.401, que se incorporan como referencia en su totalidad.

De las 400 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo (resultados mostrados en la Tabla 12), 95 fueron seleccionadas para una prueba adicional. De las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas para la prueba adicional, algunas fueron elegidas porque cumplían los criterios anteriores, y era deseable analizarlas adicionalmente. Otras fueron elegidas, a pesar de no alcanzar ciertos umbrales, de modo que esas parejas se podían volver a evaluar. Las 95 parejas de proteínas de la línea germinal que se muestran en las Figuras 16-24 se sintetizaron, se expresaron, se purificaron y después se sometieron a ensayo tanto en formato IgG1 como Fab y para estudiar lo siguiente a) expresión de Fab purificado en mg/L, b) contenido monomérico de Fab purificado (% de

monómero), c) estabilidad térmica de Fab purificado, d) expresión de IgG1 purificada en mg/L, e) contenido monomérico de IgG1 purificada (% de monómero), f) estabilidad térmica de IgG1 purificada, g) punto isoeléctrico de IgG1 y h) prueba de estrés de IgG1 con exposición al ácido, incluyendo fluorometría de barrido diferencial (DSF), absorción, dispersión de luz dinámica y tinción de partículas. En las siguientes parejas de proteínas de la línea germinal (54) se identificó que tenían una actividad funcional superior, relacionada con la capacidad de desarrollo (datos mostrados en las Figuras 16-24). La invención es una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, en donde al menos el 50% de los anticuerpos o los fragmentos funcionales comprende parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de veinticinco o más de las parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1 -40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1 -47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1 -40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1 -39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1 -40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252). Específicamente, en esta realización, las parejas de proteínas de la línea germinal (54) tenían valores umbrales en o por encima de los siguientes umbrales para cada criterio: a) rendimiento de la expresión Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 98%; y f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99%. Por lo tanto, las colecciones que comprenden cualquier valor de estas parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable, se podría utilizar para identificar anticuerpos con capacidad de desarrollo o fragmentos de los mismos contra cualquier antígeno.

En comparación con la Tabla 32 del documento WO2010/136598, la Tabla 32 muestra que solo 21 de las 54 parejas tienen ciertas propiedades funcionales diferentes.

Las realizaciones de la presente invención incluyen colecciones que comprenden un subconjunto de las parejas de proteínas de la línea germinal anteriores (36 de las 54) que tienen una actividad funcional superior, relacionada con la capacidad de desarrollo. En una realización, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1 -47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1 -39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1 -40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252). En esta realización, el subconjunto de (36) parejas de proteínas de la línea germinal se selecciona a partir de las 54 parejas de proteínas de la línea germinal basándose en los datos de la prueba de estrés. Los datos de la prueba de estrés se identificaron usando los métodos descritos en los Ejemplos 9.2.5 (a-d), datos que se muestran en las Figuras 19-24, los Ejemplo 9.2.6 (a-d), datos que se muestran en las Figuras 19-54 y en el Ejemplo 9.2.7, puntuación que se muestra en las Figuras 55-60. La prueba de estrés evaluaba las 95 parejas de proteínas de la línea germinal en formato IgG1, con el fin de determinar su capacidad para soportar la exposición al ácido y la agitación con perlas de vidrio. La capacidad de un anticuerpo para soportar la exposición al ácido es un factor cada vez más importante, ya que una etapa de la inactivación de virus es estándar durante el procesamiento posterior (DSP) de Química, Fabricación y Control (CMC). La capacidad de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para resistir fuerzas de cizallamiento es un criterio útil ya que las etapas de filtración no pueden evitarse durante el procesamiento y las fuerzas de cizallamiento se producen durante la administración a través de agujas con una jeringa o tubos de plástico.

La colección del subconjunto anterior, (36) parejas de proteínas de la línea germinal de una realización, se seleccionaron ya que tienen propiedades funcionales superiores adicionales que son relevantes para la capacidad de desarrollo, ya que mostraron una mayor resistencia frente al estrés por ácido y por agitación que las otras 54 parejas. Las 36 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas en esa realización tenían valores umbrales iguales o por encima de los siguientes umbrales para cada criterio: a) rendimiento de la expresión Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 98%; f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99% y g) puntuación acumulada de las pruebas de estrés (como se describe en el Ejemplo 9.2.7) de al menos 1225.

En comparación con la Tabla 32 del documento WO2010/136598, la Tabla 32 muestra solo 14 de las 36 parejas que tienen ciertas propiedades funcionales diferentes. Además, el documento WO2010/136598 no describe la combinación específica de las 36 parejas.

En otra realización, se seleccionaron los umbrales para cada criterio de la siguiente manera: a) rendimiento de la expresión de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 99%; f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99%; g) punto isoelectrico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.4) de al menos 8,3; y h) puntuación acumulada de las pruebas de estrés (como se describe en el Ejemplo 9.2.7) de al menos 1225. En esta realización, una colección comprende (33 parejas): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En comparación con la Tabla 32 del documento WO2010/136598, la Tabla 32 muestra solo 14 de las 33 parejas que tienen ciertas propiedades funcionales diferentes. Además, el documento WO2010/136598 no describe la combinación específica de las 33 parejas.

En una realización adicional, se añadieron parejas a una colección a pesar de que las mismas parejas no alcanzan todos los umbrales dentro de cada criterio, pero se añadieron a las colecciones con el fin de aumentar la diversidad. En una realización, una colección comprende adicionalmente: VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); y VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256). En esa realización, una colección comprende (36 parejas): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

Tales colecciones superan muchos de los problemas de la técnica anterior. Por ejemplo, las colecciones obtenidas a partir de linfocitos B incluyen parejas de VH/VL que no tienen propiedades biofísicas favorables, ya que los emparejamientos de VH y VL presentes en una colección de ese tipo son idénticos a los emparejamientos presentes en la muestra de linfocitos B. Si se toma una muestra lo suficientemente grande de linfocitos B, cada una de las aproximadamente (2500) combinaciones de emparejamientos de clases de 50 VH y 50 VL, estará presente. Los ensayos extensos de las parejas de VH y VL en la presente descripción muestran que muchas de las parejas de genes de la línea germinal de VH y VL (parejas de proteínas de la línea germinal) que existen en la naturaleza, no tienen propiedades que permitan una capacidad de desarrollo en la práctica clínica. Por lo tanto, tales genotecas de linfocitos B comprenden muchas parejas de VH y VL que probablemente no tengan capacidad de desarrollo. Por lo tanto, puede ser deseable generar genotecas con una amplia diversidad que comprendan parejas de VH y VL que tengan propiedades funcionales ventajosas, pero con una metodología de colección de linfocitos B, esto no es posible.

Por ejemplo, un aspecto de la presente descripción es una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales que comprenden las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada y ligera variable que tienen propiedades ventajosas que mejoran la capacidad de desarrollo, pero que excluyen las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera variable que no tienen tales propiedades, incluso si se expresan de forma prominente en el repertorio inmune humano. De este modo, la colección se diseñó para excluir las combinaciones o las parejas de la cadena pesada y ligera variable que se producen en la naturaleza (de las 2.500 parejas) que no logran tener propiedades funcionales ventajosas. Por ejemplo, VH4-34 aparece frecuentemente en el repertorio inmune humano como se muestra en la Tabla 5, pero también se sabe que los anticuerpos obtenidos a partir de este gen de la línea germinal de la cadena pesada pueden ser citotóxicos para los linfocitos B, por lo tanto, los anticuerpos obtenidos a partir de este gen podrían ser excluidos de un diseño de la colección. Véase, Bhat et al., Rapid cytotoxicity of human B lymphocytes induced by VH4-34 (VH4.21) gene-encoded monoclonal antibodies, Clin Exp Immunol., 105(1):183-90 (Julio 1996).

#### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra los sitios de restricción seleccionados para incorporarlos en el extremo C-terminal de las secuencias señal *phoA* y *ompA* de *E. coli*, tal y como se describe en detalle en el Ejemplo 1, e incluye los sitios de restricción alrededor de CDR 3 y sus respectivas orientaciones. Esta figura, aunque muestra las secuencias señal de *E. coli*, también representa los sitios de restricción C-terminales seleccionados para incorporarlos en las secuencias líder de la cadena pesada humana y la cadena kappa para emplear en la expresión de IgG1, tal y como se describe en detalle en el Ejemplo 1.

La **Figura 2** muestra los 20 genes de VH de la línea germinal seleccionados para la síntesis, la combinación y la caracterización funcional, como se describe en detalle en el Ejemplo 4. La figura también muestra los resultados del análisis *in silico* de cada gen de la línea germinal, en donde *pI* representa el punto isoelectrónico, PTMs son sitios de modificaciones postraduccionales potenciales en las regiones determinantes de complementariedad, tal como se describe en el presente documento, NxS/T son sitios de glicosilación ligados a N y Met en CDR son metioninas.

La **Figura 3** muestra los 8 genes de VL y 12 de VK de la línea germinal seleccionados para la síntesis, la combinación y la caracterización funcional, como se describe en detalle en el Ejemplo 4. La figura también muestra los resultados del análisis *in silico* de cada gen de la línea germinal, en donde *pI* representa el punto isoelectrónico, PTMs son

sitios de modificaciones postraduccionales potenciales en las regiones determinantes de complementariedad, tal como se describe en el presente documento, NxS/T son sitios de glicosilación ligados a N y Met en CDR son metioninas. Aquí VL significa Vλ.

La **Figura 4** muestra las parejas de VH/Vκ de los datos agrupados procedentes del Ejemplo 2.1 y el Ejemplo 2.2. Las anotaciones numéricas representan el número de cada pareja de genes VH/Vκ de la línea germinal procedente de un linfocito B individual, identificado en los datos agrupados. El eje Y muestra los genes de la línea germinal de VH clasificados de arriba (más prevalente) VH3-23 a abajo (menos prevalente) VH3-20, en términos de frecuencia de la expresión en los datos agrupados. El eje X muestra los genes de la línea germinal de Vκ clasificados de izquierda (más prevalente) IGKV3-20 a derecha (menos prevalente) IGKV1D-17, en términos de frecuencia de la expresión de los datos agrupados. El número 1358 es el número de linfocitos B en la muestra.

La **Figura 5** muestra las parejas de VH/Vλ de los datos agrupados procedentes de los Ejemplos 2.1 y el Ejemplo 2.2. Las anotaciones numéricas representan el número de cada pareja de genes VH/Vλ de la línea germinal procedente de un linfocito B individual, identificado en los datos agrupados. El eje Y muestra los genes de la línea germinal de VH clasificados de arriba (más prevalente) VH3-23 a abajo (menos prevalente) VH3-20, en términos de frecuencia de la expresión en los datos agrupados. El eje X muestra los genes de la línea germinal de Vλ clasificados de izquierda (más prevalente) IGKV2-14 a derecha (menos prevalente) IGLV4-60 en términos de frecuencia de la expresión de los datos agrupados. El número 779 es el número de linfocitos B en la muestra.

Las **Figuras 6A-C** muestran las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes de la línea germinal de VH (SEQ ID NOS 63-118, respectivamente, en orden de aparición), como se describen en Tomlinson et al., (1992), "The Repertoire of Human Germline Vh Sequences Reveals about Fifty Groups of Vh Segments with Different Hypervariable Loop" J. Mol. Biol. 227, 776-798; Matsuda et al. (1998), "The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus" J Exp Med 188(11):2151-62; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes." Exp Clin Immunogenet. 18(2):100-16.

Las **Figuras 7A-C** muestran las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes de la línea germinal de Vκ (SEQ ID NOS 119-164, respectivamente, en orden de aparición), tal y como se describen en Schähle y Zachau (1993), "The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus," Biol. Chem Hoppe Seyler. 374(11):1001-22; Brensing-Küppers et al. (1997), "The human immunoglobulin kappa locus on yeast artificial chromosomes (YACs)" Gene. 191(2):173-81; Kawasaki et al. (2001), "Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the Vκ genes" Eur J Immunol 31(4):1017-28; y Lefranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes" Exp Clin Immunogenet., 18, 161-174.

Las **Figuras 8A-B** muestran las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes de la línea germinal de Vλ (SEQ ID NOS 165-202, respectivamente, en orden de aparición), tal y como se describen en Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" Genome Research 7(3):250-61; Fripiat et al., (1995) "Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2" Hum. Mol. Genet., 4, 983-991; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. Exp Clin Immunogenet., 18:242-254.

La **Figura 9** muestra el vector tricistrónico pJPd1 de presentación en fagos de Fab.

La **Figura 10** muestra el vector de expresión de Fab pJPx1.

La **Figura 11** muestra el vector de expresión de Fab pMx11 (pMORPHX11).

La **Figura 12** muestra el vector de presentación de Fab pMORPH30.

La **Figura 13** muestra el vector de expresión de IgG1 de cadena pesada variable pJP\_h\_IgG1f.

La **Figura 14** muestra el vector de expresión de IgG de cadena ligera κ variable pJP\_h\_Ig\_kappa.

La **Figura 15** muestra el vector de expresión de IgG de cadena ligera λ variable pJP\_h\_Ig\_lambda2.

**Figura 16** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el rendimiento de la expresión de Fab purificado en mg/L (de cultivo), el contenido monomérico de Fab purificado (% de monómero), la estabilidad térmica de Fab purificado en °C, el rendimiento de la expresión de IgG1 purificada en mg/L (cultivo celular), el contenido monomérico de IgG1 purificada (% de monómero), la estabilidad térmica de IgG1 purificada en °C (la transición que se muestra es la de los dominios variables, no se muestra la transición de los dominios Fc) y el punto isoeléctrico de IgG1 de los números 1-32 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Los datos se determinaron utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 9.1.1-9.1.3 y 9.2.1-9.2.4. Aquí, VL significa Vλ.

**Figura 17** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el rendimiento de la expresión de Fab purificado en mg/L (de cultivo), el contenido monomérico de Fab purificado (% de monómero), la estabilidad térmica de Fab purificado en °C, el rendimiento

de la expresión de IgG1 purificada en mg/L (cultivo celular), el contenido monomérico de IgG1 purificada (% de monómero), la estabilidad térmica de IgG1 purificada en °C (la transición que se muestra es la de los dominios variables, no se muestra la transición de los dominios Fc) y el punto isoeléctrico de IgG1 de los números 33-64 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Los datos se determinaron utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 9.1.1-9.1.3 y 9.2.1-9.2.4. Aquí, VL significa Vλ.

**Figura 18** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el rendimiento de la expresión de Fab purificado en mg/L (Fab purificado)/L (de cultivo), el contenido monomérico de Fab purificado (% de monómero), la estabilidad térmica de Fab purificado en °C, el rendimiento de la expresión de IgG1 purificada en mg (IgG1 purificada)/L (cultivo celular), el contenido monomérico de IgG1 purificada (% de monómero), la estabilidad térmica de IgG1 purificada en °C (la transición que se muestra es la de los dominios variables, no se muestra la transición de los dominios Fc) y el punto isoeléctrico de IgG1 de los números 65-95 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Los datos se determinaron utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 9.1.1-9.1.3 y 9.2.1-9.2.4. Aquí, VL significa Vλ.

**Figura 19** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra la estabilidad térmica en °C (T<sub>m</sub> aparente) antes y después de la exposición al ácido (la T<sub>m</sub> aparente corresponde a la falta de plegamiento de los dominios variables, el punto medio de la falta de plegamiento de los dominios Fc no se muestra) como se determina utilizando fluorometría de barrido diferencial como se describe en el Ejemplo 9.2.5(a), el cambio relativo en la turbidez en base a la absorción de UV antes y durante la exposición al ácido y después de la neutralización como se describe en el Ejemplo 9.2.5(b). Los datos mostrados son de los números 1-32 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa Vλ.

**Figura 20** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el radio de partícula (nm) antes y después de la exposición al ácido y la polidispersidad antes y después de la exposición al ácido como se describe en el Ejemplo 9.2.5(c), la tinción de partículas antes y después del ácido como se describe en el Ejemplo 9.2.5(d), y la puntuación acumulada, como se describe en el Ejemplo 9.2.7. Los datos mostrados son de los números 1-32 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa Vλ.

**Figura 21** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra la estabilidad térmica en °C (T<sub>m</sub> aparente) antes y después de la exposición al ácido (la T<sub>m</sub> aparente corresponde a la falta de plegamiento de los dominios variables, el punto medio de la falta de plegamiento de los dominios Fc no se muestra) como se determina utilizando fluorometría de barrido diferencial como se describe en el Ejemplo 9.2.5(a), el cambio relativo en la turbidez en base a la absorción de UV antes y durante la exposición al ácido y después de la neutralización como se describe en el Ejemplo 9.2.5(b). Los datos mostrados son de los números 33-64 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa Vλ.

**Figura 22** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el radio de partícula (nm) antes y después de la exposición al ácido y la polidispersidad antes y después de la exposición al ácido como se describe en el Ejemplo 9.2.5(c), la tinción de partículas antes y después del ácido como se describe en el Ejemplo 9.2.5(d), y la puntuación acumulada, como se describe en el Ejemplo 9.2.7. Los datos mostrados son de los números 33-64 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa Vλ.

**Figura 23** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra la estabilidad térmica en °C (T<sub>m</sub> aparente) antes y después de la exposición al ácido (la T<sub>m</sub> aparente corresponde a la falta de plegamiento de los dominios variables, el punto medio de la falta de plegamiento de los dominios Fc no se muestra) como se determina utilizando fluorometría de barrido diferencial como se describe en el Ejemplo 9.2.5(a), el cambio relativo en la turbidez en base a la absorción de UV antes y durante la exposición al ácido y después de la neutralización como se describe en el Ejemplo 9.2.5(b). Los datos mostrados son de los números 65-95 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa Vλ.

**Figura 24** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el radio de partícula (nm) antes y después de la exposición al ácido y la polidispersidad antes y después de la exposición al ácido como se describe en el Ejemplo 9.2.5(c), la tinción de partículas antes y después del ácido como se describe en el Ejemplo 9.2.5(d), y la puntuación acumulada, como se describe en el Ejemplo 9.2.7. Los datos mostrados son de los números 65-95 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa Vλ.

La **Figura 25** muestra la proteína de la línea germinal de VH (SEQ ID NOS 204-216, respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 217-229, respectivamente, en orden de aparición) de las regiones estructurales 1 y HCDR1 de ciertas cadenas pesadas variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimi-

zados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 6, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de VH seleccionados para realizaciones de la colección.

La **Figura 26** muestra la proteína de la línea germinal de VH (SEQ ID NOS 204-216 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 217-229 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) de las regiones estructurales 2 y HCDR2 de ciertas cadenas pesadas variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 6, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de VH seleccionados para realizaciones de la colección.

La **Figura 27** muestra la proteína de la línea germinal de VH (SEQ ID NOS 204-216 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 217-229 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) de la región estructural 3 de ciertas cadenas pesadas variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 6, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de VH seleccionados para realizaciones de la colección.

La **Figura 28** muestra la proteína de la línea germinal de Vk (SEQ ID NOS 230-239, respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 240-249, respectivamente, en orden de aparición) de las regiones estructurales 1 y LCDR1 de ciertas cadenas ligeras variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 7, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de Vk seleccionados para realizaciones de la colección.

La **Figura 29** muestra la proteína de la línea germinal de Vk (SEQ ID NOS 230-239 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 240-249 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) de las regiones estructurales 2 y LCDR2 de ciertas cadenas ligeras variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 7, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de Vk seleccionados para realizaciones de la colección.

La **Figura 30** muestra la proteína de la línea germinal de Vk (SEQ ID NOS 230-239 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 240-249 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) de la región estructural 3 de ciertas cadenas ligeras variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 7, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de Vk seleccionados para realizaciones de la colección.

La **Figura 31** muestra la proteína de la línea germinal de V $\lambda$  (SEQ ID NOS 250-257, respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 258-265, respectivamente, en orden de aparición) de las regiones estructurales 1 y LCDR1 de ciertas cadenas ligeras variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 8, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de V $\lambda$  seleccionados para realizaciones de la colección. Aquí, VL significa V $\lambda$ .

La **Figura 32** muestra la proteína de la línea germinal de VA (SEQ ID NOS 250-257 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 258-265 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) de las regiones estructurales 2 y LCDR2 de ciertas cadenas ligeras variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 8, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de VA seleccionados para realizaciones de la colección. Aquí, VL significa VA.

La **Figura 33** muestra la proteína de la línea germinal de VΛ (SEQ ID NOS 250-257 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 258-265 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) de la región estructural 3 de ciertas cadenas ligeras variables. Las secuencias de aminoácidos son secuencias de proteínas de la línea germinal, como se definen en este documento. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los genes de la línea germinal que se muestran son los mismos que los mostrados en la Figura 8, pero solo incluyen los genes de la línea germinal de VΛ seleccionados para realizaciones de la colección. Aquí, VL significa VΛ.

La **Figura 34** muestra la proteína de la línea germinal de VH (SEQ ID NOS 266-278, respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 279-291, respectivamente, en orden de aparición) de las regiones estructurales 1 y HCDR1 de ciertas cadenas pesadas variables. Las secuencias de aminoácidos se han modificado dentro de HCDR1 para eliminar posibles sitios de modificación postraducciona (PTMs). Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los aminoácidos que han sido modificados en HCDR1 están subrayados y el ADN correspondiente que codifica cada posición está en negrita y subrayado.

La **Figura 35** muestra la proteína de la línea germinal de VH (SEQ ID NOS 266-278 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 279-291 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) de las regiones estructurales 2 y HCDR2 de ciertas cadenas pesadas variables. Las secuencias de aminoácidos se han modificado dentro de HCDR2 para eliminar posibles sitios de modificación postraducciona (PTMs). Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. Los aminoácidos que han sido modificados en HCDR2 están subrayados y el ADN correspondiente que codifica cada posición está en negrita y subrayado.

La **Figura 36** muestra la proteína de la línea germinal de VH (SEQ ID NOS 266-278 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ADN (SEQ ID NOS 279-291 (continuación), respectivamente, en orden de aparición) de la región estructural 3 de ciertas cadenas pesadas variables. Las secuencias de aminoácidos son de la línea germinal ya que no se eliminó ningún sitio potencial de modificación postraducciona dentro de las regiones estructurales. Las secuencias de ADN tienen codones optimizados mediante GeneArt para la expresión en *E. coli*, evitando codones humanos raros. VH1-69\*01 y VH3-23 también pueden tener nucleótidos CGT en la posición 94.

La **Figura 37** muestra anticuerpos representativos o fragmentos de anticuerpos específicos para Dkk3 identificados a partir de las subcolecciones VH3-23/VK1-39, y VH3-23/VL3-1, como se describe en el Ejemplo 11. La figura muestra la subcolección a partir de la cual fue identificado cada anticuerpo o fragmento, el antígeno, la longitud de la CDR-H3 y CDR-L3, la estabilidad térmica y la afinidad de Fab, el pI de IgG1, el rendimiento de la expresión (mg/L), la estabilidad térmica y el contenido monomérico (% de monómero) determinado por SEC. Aquí, VL significa VL.

La **Figura 38** muestra anticuerpos representativos o fragmentos de anticuerpos específicos para ErbB4/Her4\_Fc identificados a partir de las subcolecciones VH3-23/VK1-39, y VH3-23/VL3-1, como se describe en el Ejemplo 11. La figura muestra la subcolección a partir de la cual fue identificado cada anticuerpo o fragmento, el antígeno, la longitud de la CDR-H3 y CDR-L3, la estabilidad térmica y la afinidad de Fab, el pI de IgG1, el rendimiento de la expresión (mg/L), la estabilidad térmica y el contenido monomérico (% de monómero) determinado por SEC. Aquí, VL significa VL.

La **Figura 39** muestra los puntos de fusión de temperatura aparente de Fabs seleccionados según se determinó por fluorimetría de barrido diferencial (DSF) como se describe en el Ejemplo 9.1.2. Cada punto representa un Fab único. Los cuadrados indican los Fabs de control como se describen en el Ejemplo 9. Las barras indican la mediana. El control representa el anticuerpo sometido a ensayo para analizar propiedades funcionales en el Ejemplo 9, que comprende las regiones de la línea germinal FR y CDR1 y 2 de la pareja de proteínas respectiva de la línea germinal, y la CDR3 de Ewert et al. Los Fabs seleccionados se generaron en el Ejemplo 11, y difieren en la secuencia del anticuerpo de control solo en la CDR3. La estrecha agrupación en este caso, muestra que el resultado de la colección, es decir, los anticuerpos o fragmentos seleccionados contra el antígeno DKK3 o ERB4/Her4\_Fc, conservan las propiedades funcionales superiores de los miembros del diseño de la colección.

La **Figura 40** muestra las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS 293, 295, 297 y 301, respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ácido nucleico con codones optimizados (SEQ ID NOS 292, 294, 296, 298, 299, 300, 302 y 303, respectivamente, en orden de aparición) que codifican las regiones FR4 de colecciones de la invención.

Las **Figuras 41A y B** muestran la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 305) y la secuencia de ácido nucleico con codones optimizados (SEQ ID NO: 304) que codifican el dominio constante de la cadena pesada IgG1f de colecciones de la invención. Las secuencias de ácido nucleico mostradas tienen codones optimizados.

La **Figura 42** muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 307) y las secuencias de ácido nucleico con codones optimizados (SEQ ID NO: 306) que codifican el dominio constante de la cadena pesada de Fab de colecciones de la invención.

La **Figura 43** muestra las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS 309 y 311, respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ácido nucleico con codones optimizados (SEQ ID NOS 308 y 310, respectivamente, en orden de aparición) que codifican los dominios constantes de la cadena ligera kappa de IgG1f y Fab de colecciones de la invención. Las secuencias de ácido nucleico mostradas tienen codones optimizados.

La **Figura 44** muestra las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS 313 y 315, respectivamente, en orden de aparición) y las secuencias de ácido nucleico con codones optimizados (SEQ ID NOS 312 y 314, respectivamente, en



orden de aparición) que codifican los dominios constantes de la cadena ligera lambda de IgG1f y Fab de colecciones de la invención

La **Figura 45** muestra los valores del punto isoeléctrico (pI) de IgGs seleccionadas como se describe en el Ejemplo 9.2.4. Cada punto representa una IgG única. Los cuadrados indican las IgGs de control como se describen en el Ejemplo 9. Las barras indican la mediana. El control representa el anticuerpo sometido a ensayo para analizar propiedades funcionales en el Ejemplo 9, que comprende las regiones de la línea germinal FR y CDR1 y 2 de la pareja de proteínas respectiva de la línea germinal, y la CDR3 de Ewert et al. Las IgGs seleccionadas se generaron en el Ejemplo 11, y difieren en la secuencia del anticuerpo de control solo en la CDR3. La estrecha agrupación en este caso, muestra que el resultado de la colección, es decir, los anticuerpos o fragmentos seleccionados contra el antígeno DKK3 o ERb4/Her4\_Fc, conservan las propiedades funcionales superiores de los miembros del diseño de la colección.

La **Figura 46** muestra los puntos medios aparentes de la falta de plegamiento de IgGs seleccionadas según lo determinado por fluorimetría de barrido diferencial (DSF) como se describe en el Ejemplo 9.2.2. Cada punto representa una IgG única. Los cuadrados indican las IgGs de control como se describen en el Ejemplo 9. Las barras indican la mediana. El control representa el anticuerpo sometido a ensayo para analizar propiedades funcionales en el Ejemplo 9, que comprende las regiones de la línea germinal FR y CDR1 y 2 de la pareja de proteínas respectiva de la línea germinal, y la CDR3 de Ewert et al. Las IgGs seleccionadas se generaron en el Ejemplo 11, y difieren en la secuencia del anticuerpo de control solo en la CDR3. La estrecha agrupación en este caso, muestra que el resultado de la colección, es decir, los anticuerpos o fragmentos seleccionados contra el antígeno DKK3 o ERb4/Her4\_Fc, conservan las propiedades funcionales superiores de los miembros del diseño de la colección.

La **Figura 47** muestra los rendimientos de la expresión de IgGs seleccionadas como se determina por espectrofotometría UV como se describe en el Ejemplo 9.2.1. Cada punto representa una IgG única. Los cuadrados indican las IgGs de control como se describen en el Ejemplo 9. Las barras indican la mediana. El control representa el anticuerpo sometido a ensayo para analizar propiedades funcionales en el Ejemplo 9, que comprende las regiones de la línea germinal FR y CDR1 y 2 de la pareja de proteínas respectiva de la línea germinal, y la CDR3 de Ewert et al. Las IgGs seleccionadas se generaron en el Ejemplo 11, y difieren en la secuencia del anticuerpo de control solo en la CDR3. La estrecha agrupación en este caso, muestra que el resultado de la colección, es decir, los anticuerpos o fragmentos seleccionados contra el antígeno DKK3 o ERb4/Her4\_Fc, conservan las propiedades funcionales superiores de los miembros del diseño de la colección.

La **Figura 48** muestra el contenido monomérico de IgGs seleccionadas como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), tal como se describe en el Ejemplo 9.2.3. Cada punto representa una IgG única. Los cuadrados indican las IgGs de control como se describen en el Ejemplo 9. Las barras indican la mediana. El control representa el anticuerpo sometido a ensayo para analizar propiedades funcionales en el Ejemplo 9, que comprende las regiones de la línea germinal FR y CDR1 y 2 de la pareja de proteínas respectiva de la línea germinal, y la CDR3 de Ewert et al. Las IgGs seleccionadas se generaron en el Ejemplo 11, y difieren en la secuencia del anticuerpo de control solo en la CDR3. La estrecha agrupación en este caso, muestra que el resultado de la colección, es decir, los anticuerpos o fragmentos seleccionados contra el antígeno DKK3 o ERb4/Her4\_Fc, conservan las propiedades funcionales superiores de los miembros del diseño de la colección. Aquí, VL significa VΛ.

**Figura 49** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente, como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el cambio relativo en la turbidez basándose en la absorción de UV antes y durante la agitación con perlas de vidrio como se describe en el Ejemplo 9.2.6(a). Los datos mostrados son de los números 1-32 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VΛ.

**Figura 50** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra la estabilidad térmica en °C (Tm aparente) después de la agitación con perlas de vidrio (la Tm aparente dada corresponde a la falta de plegamiento de los dominios variables, el punto medio de falta de plegamiento de los dominios Fc no se muestra) como se determina usando fluorimetría de barrido diferencial como se describe en el Ejemplo 9.2.6(b) muestra el radio de partícula (nm) después de la agitación con perlas de vidrio, la polidispersidad después de la agitación con perlas de vidrio como se describe en el Ejemplo 9.2.6(c), y la tinción de partículas antes y después de la agitación con perlas de vidrio como se describe en el Ejemplo 9.2.6(d). Los datos mostrados son de los números 1-32 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VΛ.

**Figura 51** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el cambio relativo en la turbidez basándose en la absorción de UV antes y durante la prueba de estrés, tal como se describe en el Ejemplo 9.2.6(a). Los datos mostrados son de los números 33-64 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VΛ.

**Figura 52** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra la estabilidad térmica en °C (Tm aparente) después de la agitación con perlas de vidrio (la Tm aparente dada corresponde a la falta de plegamiento de los dominios variables, el punto medio de falta de plegamiento de los dominios Fc no se muestra) como se determina usando fluorimetría de barrido diferen-

cial como se describe en el Ejemplo 9.2.6(b) muestra el radio de partícula (nm) después de la agitación con perlas de vidrio, la polidispersidad después de la agitación con perlas de vidrio como se describe en el Ejemplo 9.2.6(c), y la tinción de partículas antes y después de la agitación con perlas de vidrio como se describe en el Ejemplo 9.2.6(d). Los datos mostrados son de los números 33-64 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figura 53** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra el cambio relativo en la turbidez basándose en la absorción de UV antes y durante la prueba de estrés, tal como se describe en el Ejemplo 9.2.6(a). Los datos mostrados son de los números 6-95 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figura 54** de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo adicionalmente como se describe en el Ejemplo 9, esta figura muestra la estabilidad térmica en °C ( $T_m$  aparente) después de la agitación con perlas de vidrio (la  $T_m$  aparente dada corresponde a la falta de plegamiento de los dominios variables, el punto medio de falta de plegamiento de los dominios Fc no se muestra) como se determina usando fluorometría de barrido diferencial como se describe en el Ejemplo 9.2.6(b) muestra el radio de partícula (nm) después de la agitación con perlas de vidrio, la polidispersidad después de la agitación con perlas de vidrio como se describe en el Ejemplo 9.2.6(c), y la tinción de partículas antes y después de la agitación con perlas de vidrio como se describe en el Ejemplo 9.2.6(d). Los datos mostrados son de los números 65-95 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figura 55** como se describe en el Ejemplo 9.2.7 para cada uno de los experimentos de pruebas de estrés realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6, se identificaron los valores exactos, y para cada valor exacto se proporcionó una puntuación correspondiente. Esta figura muestra la puntuación, ya sea 0, 25, 75 o 100 dada a cada valor para los experimentos completados en el Ejemplo 9.2.5, pruebas de ácido. Las puntuaciones que se muestran son de los números 1-32 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figura 56** como se describe en el Ejemplo 9.2.7 para cada uno de los experimentos de pruebas de estrés realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6, se identificaron los valores exactos, y para cada valor exacto se proporcionó una puntuación correspondiente. Esta figura muestra la puntuación, ya sea 0, 25, 75 o 100 dada a cada valor para los experimentos completados en el Ejemplo 9.2.6, agitación con perlas de vidrio. Además, esta figura muestra la puntuación acumulada, que se calculó sumando las puntuaciones de las pruebas realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6. Las puntuaciones que se muestran son de los números 1-32 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figura 57** como se describe en el Ejemplo 9.2.7 para cada uno de los experimentos de pruebas de estrés realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6, se identificaron los valores exactos, y para cada valor exacto se proporcionó una puntuación correspondiente. Esta figura muestra la puntuación, ya sea 0, 25, 75 o 100 dada a cada valor para los experimentos terminados en el Ejemplo 9.2.5, pruebas de ácido. Las puntuaciones que se muestran son de los números 33-64 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figura 58** como se describe en el Ejemplo 9.2.7 para cada uno de los experimentos de pruebas de estrés realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6, se identificaron los valores exactos, y para cada valor exacto se proporcionó una puntuación correspondiente. Esta figura muestra la puntuación, ya sea 0, 25, 75 o 100 dada a cada valor para los experimentos terminados en el Ejemplo 9.2.6, agitación con perlas de vidrio. Además, esta figura muestra la puntuación acumulada, que se calculó sumando las puntuaciones de las pruebas realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6. Las puntuaciones que se muestran son de los números 33-64 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figura 59** como se describe en el Ejemplo 9.2.7 para cada uno de los experimentos de pruebas de estrés realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6, se identificaron valores exactos, y para cada valor exacto se proporcionó una puntuación correspondiente. Esta figura muestra la puntuación, ya sea 0, 25, 75 o 100 dada a cada valor para los experimentos terminados en el Ejemplo 9.2.5, pruebas de ácido. Las puntuaciones que se muestran son de los números 65-95 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figura 60** como se describe en el Ejemplo 9.2.7 para cada uno de los experimentos de pruebas de estrés realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6, se identificaron valores exactos, y para cada valor exacto se proporcionó una puntuación correspondiente. Esta figura muestra la puntuación, ya sea 0, 25, 75 o 100 dada a cada valor para los experimentos terminados en el Ejemplo 9.2.6, agitación con perlas de vidrio. Además, esta figura muestra la puntuación acumulada, que se calculó sumando las puntuaciones de las pruebas realizadas en los Ejemplos 9.2.5-9.2.6. Las puntuaciones que se muestran son de los números 65-95 de las parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo. Aquí, VL significa VL.

**Figuras 61A-D** parejas de proteínas de la línea germinal de realizaciones de la invención se mostraron sobre fagos y se seleccionaron frente a Frizzled-4 Fc, GFP o la fusión erbB4/Her4\_Fc. Esta figura muestra las subcolecciones utilizadas, el antígeno contra el que se realiza la selección, el número de clones escrutados, los aciertos positivos de ELISA y el número de anticuerpos únicos. Aquí, VL significa VL.

**Figuras 62A-C** muestra las IgGs de subcolecciones seleccionadas contra a la fusión rhErbB4/Her4\_Fc, la fusión rhFZD-4 Fc y eGFP, como se describe en el Ejemplo 11. Las figuras muestran la subcolección a partir de la cual se identificó cada anticuerpo, el antígeno, la longitud de la CDR-H3 y CDR-L3, el  $p_i$  de IgG1, el rendimiento de la expresión de IgG1 (mg/L), la estabilidad térmica de IgG1 y el contenido monomérico (% de monómero) determinado por SEC. Aquí, VL significa VA.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención, se proporcionan las siguientes definiciones e ilustraciones.

"Base de datos o soporte legible" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier formato para el almacenamiento de datos de la secuencia y, por lo tanto, cualquier recogida de información, tal como un archivo de una base de datos, una tabla de búsqueda, una hoja de cálculo Excel o similar. En ciertas realizaciones, la base de datos está almacenada en forma electrónica, tal como un dispositivo de memoria legible por ordenador. Esto incluye medios, tales como un servidor, un cliente, un disco duro, un CD, un DVD, un asistente digital personal, como un Palm Pilot, una cinta, un disco zip, la memoria ROM interna del ordenador (del inglés, "read-only-memory") o internet o la red mundial. Otros medios para el almacenamiento de archivos accesibles con un ordenador serán obvios para un experto en la técnica.

"*in silico*" se refiere a manipulaciones, análisis o diseños realizados en un ordenador, pero también se pueden realizar igualmente en papel o mentalmente.

El término "anticuerpo" tal y como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos completos. Un anticuerpo puede ser policlonal, policlonal purificado por afinidad, monoclonal, humano, de murino o de roedor, quimérico, de camélido o anticuerpos humanizados. Un anticuerpo puede pertenecer a cualquiera de las clases de anticuerpos, tales como IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA (incluyendo las subclases humanas IgA1 e IgA2), IgD, IgE o IgM. Un "anticuerpo" es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas con enlaces disulfuro.

La expresión "fragmento" o "fragmento funcional" tal y como se usa en el presente documento, incluye cualquier fragmento que se une a antígeno, tal como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv, scFv, cadenas únicas que incluyen una porción Fc, nanocuerpos y otras estructuras similares a anticuerpos que tienen entramados distintos de las regiones estructurales variables. La expresión "fragmento funcional" incluye, pero no se limita a cualquier porción de un anticuerpo, que conserva la capacidad de unirse a un antígeno de interés.

Tal y como se emplea en esta memoria, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de la interacción entre un anticuerpo y un antígeno en los sitios antigénicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo interacciona a través de fuerzas no covalentes con un antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones hay, mayor es la afinidad. Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "afinidad elevada" hacia un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, tal como un anticuerpo IgG, se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de  $10^{-8}$  M o menor,  $10^{-9}$  M o menor o  $10^{-10}$  M o menor o  $10^{-11}$  M o menor o  $10^{-12}$  M o menor hacia un antígeno diana. Sin embargo, una unión de "afinidad elevada" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, una unión de "afinidad elevada" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de  $10^{-7}$  M o menor, o  $10^{-8}$  M o menor.

El término "Kasoc." o "Ka", tal y como se usa en el presente documento, es para referirse a la constante de la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término "Kdis" o "Kd", tal y como se usa en el presente documento, es para referirse a la constante de la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término "KD", tal y como se usa en el presente documento, es para referirse a la constante de disociación en equilibrio, que se obtiene a partir de la relación entre Kd y Ka (es decir, Kd/Ka) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la KD de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón superficial, o utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

La expresión "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) está ligado a una región constante de una clase, una función efectora y/o una especie diferente o alterada.

El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1, IgG2 o IgG4) que es proporcionada por los genes de la región constante de la cadena pesada. El isotipo también incluye versiones modificadas de una de estas clases, en donde se han realizado modificaciones para alterar la función de Fc, por ejemplo, para aumentar o reducir funciones efectoras o la unión a los receptores Fc.

La expresión "línea germinal" significa la secuencia de ácidos nucleicos que codifica anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que se transmite de padres a hijos.

La expresión "secuencia de proteínas de la línea germinal" o "secuencia de aminoácidos de la línea germinal" significa a) la secuencia de aminoácidos de una región variable de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, codificada por un gen de la línea germinal, b) la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos modificada que codifica una región variable de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una región variable de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo codificado por un gen de la línea germinal, en donde la secuencia de ácidos nucleicos está modificada, por ejemplo, mediante la optimización de codones, la adición de sitios de restricción deseados, un contenido optimizado en GC, la eliminación de sitios de corte y empalme de ARNm no deseados o la eliminación de motivos de inestabilidad del ARNm, o c) una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de la línea germinal, pero con mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos, tales como, con el fin de eliminar una cisteína no deseada o la introducción de sitios de restricción deseados, por ejemplo, BbsI, o que es el resultado de errores en la síntesis, la amplificación o la clonación. Ejemplos de "secuencias de proteínas de la línea germinal" o "secuencias de aminoácidos de la línea germinal" se muestran en las Figuras 6-8 y 25-33. Además, "secuencia de proteínas de la línea germinal" o "secuencia de aminoácidos de la línea germinal" incluyen las estructuras artificiales tal y como se preparan en el Ejemplo 5, que comprenden

a) para VH: secuencia líder (phoA modificada que incorpora un sitio RE NheI como se muestra en la Tabla 1); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio RE BssHII (GCGCGC) como se muestra en la Fig. 1); CDR-H3 (WGDDGFYAMDY) (SEQ ID NO: 1) del anticuerpo 4D5 como se emplea en Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y JH4 FR4 (que incorpora un sitio RE XhoI (CTCGAG) como se muestra en la Fig. 1);

b) para Vk: secuencia líder (ompA que incorpora el sitio RE NdeI como se muestra en la Tabla 2); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio RE BbsI (GAAGAC) como se muestra en la Fig. 1), CDR-L3 similar a kappa (QQHYTTPPT) (SEQ ID NO: 2) de acuerdo con Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y Jk1 FR4 (que incorpora un sitio RE KpnI (GGTACC) como se muestra en la Fig. 1); y

c) para Vλ: secuencia líder (ompA que incorpora el sitio RE NdeI como se muestra en la Tabla 2); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio RE BbsI (GAAGAC) como se muestra en la Fig. 1), CDR-L3 similar a lambda (QSYDSSLGCVV) (SEQ ID NO: 3) de acuerdo con Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y Jλ2/3 FR4 (que incorpora un sitio RE KpnI/Acc65I (GGTACC) como se muestra en la Fig. 1).

Las "secuencias de proteínas de la línea germinal" o "secuencias de aminoácidos de la línea germinal" de los anticuerpos codificados por los genes de la línea germinal se describen en las siguientes publicaciones, para VH: Tomlinson et al., (1992), "The Repertoire of Human Germline Vh Sequences Reveals about Fifty Groups of Vh Segments with Different Hypervariable Loop" J. Mol. Biol. 227, 776-798; Matsuda et al. (1998), "The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus" J Exp Med 188(11):2151-62; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes." Exp Clin Immunogenet. 18(2):100-16; para Vλ: Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" Genome Research 7(3):250-61; Fripiat et al., (1995) "Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2" Hum. Mol. Genet., 4, 983-991; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. Exp Clin Immunogenet.; 18:242-254; y para Vk: Schåble y Zachau (1993), "The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus," Biol. Chem Hoppe Seyler. 374(11):1001-22; Brensing-Küppers et al. (1997), "The human immunoglobulin kappa locus on yeast artificial chromosomes (YACs)" Gene. 191(2):173-81; Kawasaki et al. (2001), "Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the V kappa genes" Eur J Immunol 31(4):1017-28; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes" Exp Clin Immunogenet., 18, 161-174, las cuales se incorporan todas ellas en este documento como referencia en su totalidad.

En algunas partes de la memoria descriptiva, por ejemplo, la Figura 5, la nomenclatura de los genes de la línea germinal del dominio variable utilizados dentro de la presente solicitud son IMGT, como se describe en las publicaciones de LeFranc et al. citadas en el párrafo anterior. Con respecto a la nomenclatura, "VH" e "IGHV" significan dominio variable de la cadena pesada, en donde la numeración de los genes es IMGT; "VL", "Vλ" e "IGLV" significan dominio variable de la cadena ligera lambda, en donde la numeración de los genes es IMGT y "Vk", "VK" e "IGKV" significan dominio variable de la cadena ligera kappa, en donde la numeración de los genes es IMGT. Alternativamente, "VL" se puede utilizar en el sentido de cadena ligera variable, incluyendo Vk y Vλ.

La expresión "secuencia de genes de la línea germinal" significa a) la secuencia de ácido nucleico de un gen de la línea germinal que codifica una región variable de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, o b) una secuencia de ácido nucleico modificada que codifican una región variable de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una región variable de un anticuerpo codificado por un gen de la línea germinal, en donde la secuencia de ácido nucleico está modificada, por ejemplo, mediante la optimización de codones, la adición de sitios de restricción deseados, un contenido en GC optimizado, la eliminación de sitios de corte y empalme no deseados o la eliminación de motivos de inestabilidad del ARNm.

La expresión "pareja(s) de genes de la línea germinal" significa la pareja de secuencias de ácido nucleico, y su gen de la línea germinal correspondiente, que codifica una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo. Por ejemplo, una pareja de genes de la línea germinal podría ser VH3-23/Vk1-5, en donde el anticuerpo codificado por VH3-23/Vk1-5 comprende una cadena pesada variable, o una porción de la misma, codificada por el gen de la línea germinal VH3-23 y una cadena ligera variable, o una porción de la misma, codificada por el gen de la línea germinal Vk1-5.

La expresión "pareja de proteínas de la línea germinal" significa un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, en el que la cadena pesada variable, o una porción de la misma, y la cadena ligera variable, o una porción de la misma, a) están codificadas cada una por un gen específico de la línea germinal, o b) están codificadas cada una por una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica una región variable de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una región variable de un anticuerpo codificado por el gen específico de la línea germinal, en donde la secuencia de ácido nucleico está modificada, por ejemplo, mediante la optimización de codones, la adición de sitios de restricción deseados, un contenido mejorado en GC, la eliminación de sitios de corte y empalme de ARNm no deseados o la eliminación de motivos de inestabilidad del ARNm, o c) cada una comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de la línea germinal, pero con mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos, como con el fin de eliminar una cisteína no deseada, o la introducción de sitios de restricción deseados, por ejemplo BbsI, o que es el resultado de errores en la síntesis, la amplificación o la clonación. Por ejemplo, una pareja de proteínas de la línea germinal podría ser el anticuerpo o un fragmento funcional codificado por VH3-23/Vk1-5, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada variable, o una porción de la misma, codificada por el gen de la línea germinal VH3-23 y una cadena ligera variable, o una porción de la misma, codificada por el gen de la línea germinal Vk1-5. Una "pareja de proteínas de la línea germinal" incluye las estructuras artificiales preparadas como en el Ejemplo 5, que comprenden

a) para VH: secuencia líder (phoA modificada que incorpora un sitio RE NheI como se muestra en la Tabla 1); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio RE BssHII (GCGCGC) como se muestra en la Fig. 1); CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) (SEQ ID NO: 1) del anticuerpo 4D5 como se emplea en Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y JH4 FR4 (que incorpora un sitio RE XhoI (CTCGAG) como se muestra en la Fig. 1);

b) para Vk: secuencia líder (ompA que incorpora el sitio RE NdeI como se muestra en la Tabla 2); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio RE BbsI (GAAGAC) como se muestra en la Fig. 1), CDR-L3 similar a kappa (QHYHTTPT) (SEQ ID NO: 2) de acuerdo con Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y Jk1 FR4 (que incorpora un sitio RE KpnI/Acc65I (GGTACC) como se muestra en la Fig. 1); y

c) para VL: secuencia líder (ompA que incorpora el sitio RE NdeI como se muestra en la Tabla 2); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio BbsI RE (GAAGAC) como se muestra en la Fig. 1), CDR-L3 similar a lambda (QSYDSSLGTV) (SEQ ID NO: 3) de acuerdo con Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y la JI2/3 FR4 (que incorpora un sitio RE KpnI/Acc65I (GGTACC) como se muestra en la Fig. 1).

El término "pareja de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable" o "pareja de VH/VL" significa la combinación de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable. Un anticuerpo y un fragmento funcional, por ejemplo, un Fab, comprende al menos una cadena pesada variable unida a una cadena ligera variable, que forman la región de unión a antígeno. Un ejemplo, de una pareja de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable es el anticuerpo o un fragmento funcional o una porción del mismo, que comprende secuencias de aminoácidos de la línea germinal de VH3-23/Vk1-5 o codificadas por los genes de la línea germinal VH3-23/Vk1-5, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada variable o una porción de la misma, que comprende secuencias de aminoácidos de la línea germinal de VH3-23 o codificadas por el gen VH3-23 de la línea germinal y una cadena ligera variable o una porción de la misma, que comprende secuencias de aminoácidos de la línea germinal de Vk1-5, o codificadas por el gen Vk1-5 de la línea germinal.

La expresión "sustancialmente la totalidad" significa al menos 90%. Por ejemplo, sustancialmente la totalidad de los anticuerpos o fragmentos funcionales comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de aminoácidos de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que tienen ciertas propiedades, significa que al menos el 90% de los anticuerpos o fragmentos comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, que comprenden secuencias de aminoácidos de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que tiene tales propiedades.

Las secuencias de JH4 para regiones de la cadena pesada variable, Jk1 para regiones de la cadena ligera variable  $\kappa$ , y JI2/3 para regiones de la cadena ligera  $\lambda$  variable se describen en las siguientes publicaciones: Scaviner et al., (1999), "Protein displays of the human immunoglobulin heavy, kappa and lambda variable and joining regions" Exp Clin Immunogenet. 16(4):234-40; para JH: Ravetch et al., (1981), "Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes". Cell 27 (3 pt 2): 583-91; para JK: Hieter et al. (1982), "Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes". J Biol Chem 257(3):1516-22; para JL: Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" Genome Research

7(3):250-61 que se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. La secuencia de aminoácidos de JH4 es (YFDYWGQGTLVTVSS) (SEQ ID NO: 4); la secuencia de aminoácidos de Jk1 es (WTFGQGKVEIK) (SEQ ID NO: 5); y la secuencia de aminoácidos de Jλ2/3 es (VVFGGGKTLTVL) (SEQ ID NO: 6).

La expresión "dominio/región variable (VH o VL)" significa la región de una inmunoglobulina que comprende uno o varios dominios de Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los ácidos nucleicos de VL (incluyendo Vk y Vλ), VH, JL (incluyendo Jk y Jλ) y JH que componen los loci genéticos de la inmunoglobulina de cadena ligera (incluyendo κ y λ) y de cadena pesada, respectivamente. Una región variable de cadena ligera o pesada (VL y VH) se compone de una región "estructural" o "FR" intercalada con tres regiones hipervariables denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDRs". La extensión de la región estructural y las CDRs se ha definido con precisión, véase Kabat, 1991, J. Immunol., 147, 915-920; Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883; Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273: 927-948); véase también <http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Numbering/NumFrame.html> (que muestra las convenciones sobre la numeración bien conocida de aminoácidos de anticuerpos y la ubicación de las CDRs y las regiones estructurales), y que se utiliza en las Figuras 25-36.

La expresión "región estructural" significa la parte de dominio variable que sirve como entramado para los bucles de unión al antígeno. Ejemplos de las regiones estructurales incluyen FR1, FR2, FR3 y FR4 de cualquiera de las cadenas ligera variable o pesada variable.

La expresión "región determinante de la complementariedad" o "CDR" significa bucles de unión a antígeno. Cada uno de los dos dominios variables de un fragmento Fv de anticuerpo contiene tres CDRs. Las regiones determinantes de complementariedad incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de cualquiera de las cadenas ligera variable o pesada variable.

La expresión "repertorio inmune humano" significa un repertorio de los ácidos nucleicos aislados a partir de linfocitos B del sistema inmune de un ser humano. Un repertorio puede ser el de un individuo o una población, y puede provenir de linfocitos B no activados y/o de linfocitos B con experiencia con antígenos. La presente invención es susceptible de determinar un repertorio inmune a partir de un solo individuo, siempre que se obtengan suficientes linfocitos B. Preferiblemente, el repertorio inmune se obtiene a partir de múltiples individuos para evitar sesgos de la muestra. Un ejemplo de un repertorio inmune humano se describe en los Ejemplos 2-3

Un "antígeno" y un "inmunógeno" se definen como cualquier molécula a la que se une específicamente un anticuerpo.

La expresión "específico de un agente inmunógeno" significa la asociación específica entre un anticuerpo y una molécula correspondiente. La especificidad se puede determinar por los métodos que se describen en el Ejemplo 11, tales como ELISA y/o Biacore.

Una "diversificación de la CDR" o "CDR diversificada" se obtiene mediante la variación de la composición de aminoácidos dentro de una CDR. Una CDR diversificada se puede encontrar en una colección de anticuerpos o fragmentos que tienen una o varias regiones estructurales idénticas, por ejemplo, regiones estructurales de la línea germinal, en donde los anticuerpos o fragmentos tienen CDR3s que comprenden secuencias de aminoácidos diferentes. Las CDRs diversificadas pueden obtenerse por cualquier método conocido por un experto en la técnica, incluyendo los métodos descritos por los siguientes documentos: WO9708320, Patente de EE.UU. n° 6.300.064, WO2008053275, US 12/158.181, WO07056441, US60/806602, WO2009036379, US 60/993785, WO2009114815, 12/922.153, WO020617071, US12/762.051. Las CDRs son conocidas en general, por ser regiones de unión a inmunógeno, por lo tanto al tener colecciones que comprenden miembros que representan una gran diversidad dentro de las CDRs, en particular CDR3, aumenta la posibilidad de que una colección comprenda anticuerpos o fragmentos de los mismos que tengan especificidad y propiedades óptimas para cualquier inmunógeno.

El término "variante" se refiere a un anticuerpo o un fragmento que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de otro anticuerpo o fragmento. El término "variante" incluye anticuerpos o fragmentos que son esencialmente idénticos en la secuencia de las regiones estructurales, pero que tienen diferentes secuencias de aminoácidos en una región CDR, por ejemplo, CDR3. Las variantes de una pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, tienen esencialmente la misma secuencia de aminoácidos dentro de las regiones estructurales, pero tienen diferentes secuencias de aminoácidos dentro de la región CDR3.

El término "síntesis" o "sintetizado" significa la síntesis de genes, en donde secuencias de ácidos nucleicos se sintetizan en ADN físico, que comprende polinucleótidos. La síntesis convencional de ADN comprende la síntesis de nucleótidos aislados, en donde se generan oligonucleótidos de cadena sencilla y, a continuación los oligonucleótidos solapantes se ligan usando un ensamblaje de tipo PCR. Empresas, tales como por ejemplo, Sloning (Puchheim, Alemania), Geneart (Regensburg, Alemania), DNA2.0 (Menlo Park, CA, EE.UU.), Entelechon (Regensburg, Alemania) y Genscript (Piscataway, NJ EE.UU.) ofrecen tecnología de síntesis de genes. Sloning, por ejemplo, utiliza un conjunto de nucleótidos en tripletes bicatenarios prefabricados.

El término "sintético" describe una molécula que se produce fuera del cuerpo humano por síntesis o que se sintetiza, por ejemplo, ADN. El término "sintético" también describe una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento que se traduce a partir de una molécula de ADN sintético.

5 El término "colección" o "genoteca" significa al menos dos miembros. El término "miembro" incluye, pero no se limita a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos o a los mismos anticuerpos o sus fragmentos.

10 La expresión "ácido nucleico" se usa en el presente documento de forma intercambiable con el término "polinucleótido" o "ADN" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos, ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria. La expresión incluye ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces modificados de la estructura principal, que son sintéticos, de origen natural y no natural, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metil ribonucleótidos y ácidos péptido-nucleicos (PNAS).

15 A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular incluye también implícitamente variantes de la misma modificadas de manera conservadora, (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir generando secuencias en las que se sustituye la tercera posición de uno o varios codones seleccionados (o todos) con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosinas (Batzer et al., Nucleic Acid. Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; y Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

25 Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "codones optimizados" u "optimización de codones" significa que una secuencia de nucleótidos ha sido alterada de modo que incluye codones que son preferidos en un sistema de producción determinado, por ejemplo, una célula u organismo. La secuencia de nucleótidos optimizada está diseñada genéticamente para conservar la secuencia de aminoácidos codificada originalmente por la secuencia de nucleótidos de partida. Además, la secuencia de nucleótidos se puede diseñar para que esté desprovista completamente o tanto como sea posible de motivos inhibidores, sitios de corte y empalme del ARNm, motivos de inestabilidad del ARNm y sitios de restricción indeseados. También se puede optimizar el contenido en GC, los sitios de restricción deseados y otros parámetros. Las secuencias se pueden optimizar para la expresión en diferentes hospedadores, incluyendo células bacterianas o eucariotas, específicamente células de mamífero. Las secuencias de aminoácidos codificados por secuencias de nucleótidos optimizadas también se pueden denominar optimizadas.

30 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos presentes en la naturaleza y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y a miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúan de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos.

45 Los términos "idéntico" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma.

50 El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que está ligado. Los vectores preferidos son aquellos capaces de una replicación autónoma y/o de una expresión de ácidos nucleicos a los que están ligados. Los vectores capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están ligados funcionalmente se denominan en esta memoria "vectores de expresión". Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales dentro del genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero). Otros vectores se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Tales vectores se denominan en esta memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. Los vectores pueden ser compatibles con células eucariotas o procariotas. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y

"vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector empleada más comúnmente. Sin embargo, la invención se entiende que incluye otras formas de este tipo de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes.

- 5 Los vectores incluyen típicamente un replicón procariota que puede incluir un promotor procariota capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) de los homólogos que codifican VH y/o VL en una célula hospedadora bacteriana, tal como *Escherichia coli* transformada con el mismo. Adicionalmente, los vectores incluyen vectores de expresión de IgG para uso en células de mamífero, por ejemplo, véanse las Figuras 13-15. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite la unión de una ARN polimerasa y que
- 10 tenga lugar la transcripción. Las secuencias de promotores compatibles con hospedadores bacterianos se proporcionan típicamente en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN. Ejemplos de tales plásmidos de vectores incluyen pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329, pPL y pKK223, disponibles comercialmente.

- 15 Un "vector de presentación" incluye una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante extracromosómicamente en una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora bacteriana, transformada con el mismo. Tales secuencias de ADN son bien conocidas en la técnica. Los vectores de presentación pueden ser, por ejemplo, vectores de fagos o vectores fagémidos procedentes de la clase fd, M13 o bacteriófago filamentoso fl. Tales vectores son capaces de facilitar la presentación de una proteína, incluyendo, por ejemplo, una proteína de unión o un fragmento de la misma, en la superficie de un bacteriófago filamentoso. Vectores de presentación adecuados para su presentación en fagos, ribosomas, ADN, células bacterianas o células eucariotas, por ejemplo, levadura o células de mamífero, también son conocidos en la técnica, por ejemplo, como son los vectores víricos o vectores que codifican proteínas quiméricas.
- 20

- 25 La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que tales expresiones se refieren no solo a la célula objeto en particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede ser que de hecho no sea idéntica a la célula progenitora, pero se sigue incluyendo dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal y como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras típicas son procariotas (tales como bacterias, incluyendo pero no limitadas a *E. coli*) o eucariotas (que incluyen levadura, células de mamífero y otras). Las células bacterianas son células hospedadoras procariotas preferidas y típicamente son una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*), tal como, por ejemplo, la cepa de *E. coli* DH5 disponible en Bethesda Research Laboratories, Inc., Bethesda, Md. Las células hospedadoras eucariotas preferidas incluyen células de levadura y de mamífero incluyendo múridos y roedores, preferiblemente células de vertebrados tales como las de ratón, rata, mono o una línea de células humanas, por ejemplo, células HKB11, células PERC.6 o células CHO.
- 30

- 35 La introducción de vectores en células hospedadoras se puede realizar mediante una serie de métodos de transformación o transfección conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen precipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, fusión de eritrocitos sin núcleo, fusión de protoplastos, infección vírica y similares. La producción de anticuerpos monoclonales de longitud completa, fragmentos Fab, fragmentos Fv y fragmentos scFv es bien conocida.

- 40 La transformación de los hospedadores celulares apropiados con una molécula de ADN recombinante se lleva a cabo por métodos que dependen típicamente del tipo de vector y las células utilizadas. Con respecto a la transformación de las células hospedadoras procarióticas, véase, por ejemplo, Cohen et al., Proceedings National Academy of Science, USA, Vol. 69, P. 2110 (1972); y Maniatis et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982). Con respecto a la transformación de células de vertebrados con vectores retrovirales que contienen ADN<sub>r</sub>, véase, por ejemplo, Sorge et al., Mol. Cell. Biol., 4:1730-1737 (1984); Graham et al., Virol., 52:456 (1973); y Wigler et al., Proceedings National Academy of Sciences, USA, Vol. 76, P. 1373-1376 (1979).
- 45

eGFP (proteína fluorescente verde mejorada) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

50 MSGSHHHHHGTMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY  
GKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFKFSAMPEGYVQ ERTIFFKDDGNYKTRAEVK-  
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYI MADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD-  
HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKDI. Los aminoácidos subrayados y en cursiva representan el marcador His, y aquellos solamente subrayados representan la adición de una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción.

## 55 Colecciones de anticuerpos o fragmentos de los mismos

La presente descripción permite colecciones de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos y los ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos o fragmentos que se pueden utilizar en la identificación de anticuerpos terapéuticos contra cualquier diana, en donde los anticuerpos o fragmentos tienen capacidad de desarrollo clínico, son seguros y eficaces en los pacientes. Como base, los inventores consideran que las parejas de genes de la línea



germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable abundantes en el repertorio inmune humano (tales como, VH3-23/VK1-5) probablemente tienen propiedades biofísicas favorables que conduzcan a un desarrollo más eficiente y un aumento de la seguridad y la eficacia de los anticuerpos resultantes en los pacientes. Tales propiedades biofísicas favorables podrían incluir: a) una tasa de presentación relativamente alta en el formato Fab; (b) un rendimiento elevado de la expresión relativa de Fab; c) una estabilidad frente a la temperatura tanto en formato IgG como Fab; d) una estabilidad en suero bovino/ratón tanto en formato IgG como Fab; e) un rendimiento elevado de la expresión de IgG1; e) un contenido monomérico determinado por SEC (% de monómero) en formato IgG y Fab; y/o f) un punto isoeléctrico (pi) elevado de IgG1.

Cada linfocito B codifica un anticuerpo, y cada anticuerpo comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable. Cada una de las cadenas pesadas variables y ligeras variables de un anticuerpo se puede alinear con una secuencia de genes de la línea germinal (o secuencia de proteína de la línea germinal) con el fin de determinar el origen del anticuerpo, es decir, a partir de qué gen de la línea germinal se han obtenido de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable. Por lo tanto, para cada anticuerpo, se puede decir, que la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden una pareja de genes de la línea germinal o una pareja de proteínas de la línea germinal, por ejemplo, VH3-23 emparejado con VK1-5.

Con el fin de probar la hipótesis de que las parejas de proteínas de la línea germinal abundantes en el repertorio inmune humano probablemente tienen propiedades biofísicas favorables, la primera etapa era identificar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable (parejas de proteínas de la línea germinal) presentes en el repertorio inmune humano. En algunos aspectos, los datos se obtienen a partir de publicaciones disponibles al público o bases de datos y de la toma de muestras de linfocitos B.

Se identificaron los siguientes artículos y se analizaron en detalle: Wardemann H. et al. (2003) Science 301, 1374-1377 and any supporting tables; Yurasov S. et al. (2005) J. Exp. Med. 201, 703-712 y cualquier tabla de soporte; Tsuiji M. et al. (2006) J. Exp. Med. 203, 393-401 y cualquier tabla de soporte; Yurasov S. et al. (2006) J. Exp. Med. 203, 2255-2262 y cualquier tabla de soporte, Tiller T. et al. (2007) Immunity 26, 205-213 y cualquier tabla de soporte, y Mietzner B. et al. (2008) PNAS 105, 9727-9732 y cualquier tabla de soporte. Alternativamente, se pueden hacer búsquedas en bases de datos, tales como NCBI, usando Ig-Blast. En el año 2005, la base de datos contenía al menos 25.000 secuencias de anticuerpos humanos reorganizadas en formato FASTA. De las 22.500 entradas, 13.235 representaban secuencias de VH, 1506 representaban Vk y 2259 representaban Vλ.

En general, en las publicaciones disponibles al público o bases de datos pertinentes, se siguieron los métodos siguientes: se aislaron linfocitos B a partir de donantes humanos, los linfocitos B se clasificaron para determinar su estado de desarrollo o diferenciación, se generaron ADNc y se amplificaron representando el ADN que codifica el anticuerpo a partir de cada linfocito B, los ADNc se secuenciaron, los ADNc que codificaban la cadena pesada variable y las cadenas ligeras variables se alinearon con las secuencias génicas conocidas de la línea germinal, y se determinó la pareja de genes de la línea germinal para cada linfocito B.

En algunas realizaciones, los datos se obtuvieron a partir de la toma de muestras y el aislamiento de linfocitos B humanos, lo que comprendía un método similar al utilizado en las publicaciones. En estos aspectos, el método para producir una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprende la etapa de obtener datos que comprenden las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano; en donde la etapa de obtención comprende además las etapas de aa) aislar linfocitos B humanos a partir de una muestra; ab) generar ADNc a partir de los linfocitos B; ac) amplificar mediante PCR el ADNc procedente de los linfocitos B; ad) secuenciar los productos de la PCR; y ae) identificar los genes de la línea germinal de los productos de la PCR. Ambos conjuntos de datos proporcionaron las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que están presentes en el repertorio inmune humano.

Empleando los datos de secuencias de anticuerpos, un experto en la técnica puede identificar familias y/o genes de la línea germinal de cada dominio variable de VH, Vk y Vλ. Usando este enfoque, la prominencia de cada familia y/o gen de la línea germinal de VH y VL, y/o la familia y/o gen de la línea germinal de cada pareja del dominio VH y VL, puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica.

Los datos no procesados obtenidos a partir de las publicaciones y los linfocitos B se agruparon, se analizaron y las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano se clasificaron, en términos de cantidad de cada uno. A partir de estos datos era evidente que ciertas parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable están presentes con más frecuencia que otras en el repertorio inmune humano. Se espera que esas parejas promientes tengan propiedades biofísicas superiores.

Como etapa siguiente, había que determinar qué parejas de proteínas de la línea germinal se iban a someter a ensayo para estudiar las propiedades funcionales relevantes para la capacidad de desarrollo, ya que existen ~2500 parejas en el repertorio inmune humano. Una forma sería someter a ensayo las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que aparecen con más prominencia en el repertorio inmune humano, por ejemplo, véase la Tabla 6. Se podrían seleccionar, por ejemplo, las mejores cuatrocientas

parejas para las pruebas o seleccionar las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes por encima de un cierto valor umbral. Este enfoque, sin embargo, requeriría la síntesis y someter a ensayo un número muy grande de secuencias de parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable; por lo tanto, este enfoque no sería muy eficaz.

- 5 Como metodología alternativa, los inventores seleccionaron un subconjunto de las parejas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que era representativo, reproducía con precisión o incluía la mayoría de las parejas prominentes procedentes del repertorio inmune humano. Esta metodología se basaba, en parte, en la observación de que un pequeño número de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable, son dominantes en el repertorio inmune humano. Wildt et al. en las páginas 895-896 describen este fenómeno. Wildt et al. también establecen que los segmentos de genes de la cadena pesada y ligera expresados de forma frecuente, están emparejados con frecuencia, y observaron que la mitad de los emparejamientos sometidos a ensayo se correspondía solo con cinco parejas de la línea germinal. Por lo tanto, un pequeño número de genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera prominentes, se puede combinar para generar un grupo de parejas que son representativas del repertorio inmune humano.
- 15 Por lo tanto, se analizaron los datos no procesados para determinar los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable (no emparejadas) prominentes en el repertorio inmune humano. Las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable se evaluaron entonces para determinar sus propiedades biofísicas relevantes para el desarrollo. Las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera  $\kappa$  variable y la cadena ligera  $\lambda$  variable se evaluaron *in silico* para estudiar las siguientes propiedades: la longitud de las CDRs, el punto isoeléctrico (pI), el punto isoeléctrico preferido es 7,5 o superior ya que debería proporcionar estabilidad en un tampón de formulación con pH estándar 5,5 a pH 7, sitios de sitios potenciales de modificaciones postraduccionales (PTMs) en las regiones determinantes de complementariedad (específicamente, sitios de glicosilación ligados a N (NxS o NxT) o modificaciones químicas tales como la escisión de Asp (frecuentemente en un DP), la isomerización de Asp (DD, DG), la desamidación (NS, NG) que pueden tener lugar *in vivo* (en suero) o después de un almacenamiento en tampón de formulación y conducen a la pérdida de unión del antígeno), la presencia de metioninas en las CDRs (pueden oxidarse cuando se exponen a un disolvente), la presencia de cisteínas no apareadas (formarán enlaces disulfuro con cualquier otra cisteína no apareada, lo que conducirá a una reticulación de las proteínas y/o a niveles de expresión más bajos), desviaciones de la línea germinal, la presencia de posibles epítomos de linfocitos T, y la tendencia a una agregación teórica.

Como se muestra en la Tabla 5 y las Figuras 2 y 3, en general, se seleccionaron las 20 mejores VH, las 8 mejores VL y las 12 mejores V $\kappa$  para la síntesis, la combinación y el análisis funcional subsiguiente. Las secuencias de genes de la línea germinal se sintetizaron y después se combinaron con el fin de generar 400 parejas de proteínas de la línea germinal que son representativas de las parejas de genes de la línea germinal encontradas en el repertorio inmune, en donde cada una de las regiones variables tiene propiedades biofísicas favorables identificadas *in silico*. Las 400 parejas de proteínas de la línea germinal de VH/VL se sometieron a ensayo para determinar las propiedades siguientes: a) presentación relativa después de la producción en fagos y ELISA para fagos en el formato Fab, b) rendimiento de la expresión relativa de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*; lisis celular de *E. coli* y detección con ELISA del Fab producido; c) estabilidad frente a la temperatura de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis celular de *E. coli* y detección cpm ELISA de Fab no desnaturalizado después de la incubación a temperaturas elevadas; d) estabilidad en suero bovino/ratón de Fab procedente de lisados de *E. coli* mediante la detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de la incubación en suero bovino/ratón; e) niveles de rendimiento de la expresión relativa de IgG1 humana después de la producción de IgG1 en células de mamífero y detección con ELISA de IgG1 secretada procedente del material sobrenadante de un cultivo de células; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 humana mediante detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de incubar en suero bovino/ratón.

De las 400 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo (resultados mostrados en la Tabla 12), 95 fueron seleccionadas para una prueba adicional. Después de la síntesis, expresión y purificación, las 95 parejas de proteínas de la línea germinal que se muestran en las Figuras 16-24, se sometieron a ensayo en ambos formatos Fab e IgG1 para estudiar lo siguiente a) el rendimiento de la expresión de Fab purificado en mg/L, b) el contenido monomérico de Fab purificado (% de monómero), c) la estabilidad térmica de Fab purificado, d) el rendimiento de la expresión de IgG1 purificada en mg/L, e) el contenido monomérico de IgG1 purificada (% de monómero), f) la estabilidad térmica de IgG1 purificada, g) el punto isoeléctrico de IgG1 y h) la prueba de estrés de IgG1 con exposición a ácido, incluyendo fluorometría de barrido diferencial (DSF), absorción, dispersión de luz dinámica y tinción de partículas. Los resultados se muestran en las Figuras 16-24.

En una realización, se fijaron los siguientes valores umbrales i) rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L; ii) estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab; iii) contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98%, determinado por SEC; iv) rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L; v) estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1; y vii) contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99% según se determinó mediante SEC. Por lo tanto, en una realización, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos.

cos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal en donde dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades

- 5 i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
- iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98%, determinado por SEC;
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;
- v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1; y
- 10 vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC.

En realizaciones adicionales, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades:

- i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
- 20 iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98%, determinado por SEC;
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;
- v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1; y
- vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC.

En realizaciones adicionales, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales consisten en o consisten esencialmente en regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades:

- 30 i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
- iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98%, determinado por SEC;
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;
- v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1; y
- 35 vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC.

En ciertas realizaciones,

- i) el rendimiento de la expresión en formato Fab se determinó por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,538 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm.

En ciertas realizaciones,

- 40 ii) la estabilidad térmica en formato Fab fue determinada por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS.

En ciertas realizaciones,

- iii) el contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 HR10/30 y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

En ciertas realizaciones,

iv) el rendimiento de la expresión en formato IgG1 se determinó por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,369 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm.

En ciertas realizaciones,

- 5 v) la estabilidad térmica en formato IgG1 fue determinada por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS.

En ciertas realizaciones,

vi) el contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Tosoh TSK-Gel G3000SWxl y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

- 10 La espectrofotometría UV se puede llevar a cabo usando el sistema Nanadrop (peqlab, Erlangen, Alemania). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando el termociclador iCycler iQ5 (Biorad). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). La cromatografía de exclusión por tamaño se puede realizar utilizando el sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare).

- 15 Las siguientes (54) parejas de proteínas de la línea germinal presentaban valores iguales o por encima de los umbrales siguientes, utilizando el método descrito anteriormente: i) rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L; ii) estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab; iii) contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98%, determinado por SEC; iv) rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L; v) estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1; y vii) contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC, por lo tanto, tienen una actividad funcional superior, relacionada con la capacidad de desarrollo, (datos mostrados en las Figuras 16-24): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252). Por lo tanto, las colecciones que comprenden cualquier cantidad de estas parejas de proteínas de la línea germinal se podrían utilizar para identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos con capacidad de desarrollo contra cualquier antígeno.

- 50 En un aspecto, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable específicas, por ejemplo, VH1-18/VK1-39. Esto significa que la colección comprende anticuerpos o fragmentos, en donde las regiones estructurales de los anticuerpos o fragmentos comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de VH1-18/VK1-39, en donde las regiones estructurales de la cadena pesada variable comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de VH1-18 y las regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de VK1-39. Se sometió a ensayo un gran número de parejas de proteínas

de la línea germinal, como a estructuras artificiales (como se describen en los Ejemplos 5 y 9), para estudiar sus propiedades funcionales relacionadas con el desarrollo. Un número de estructuras artificiales sometidas a ensayo mostraba propiedades funcionales superiores relacionadas con la capacidad de desarrollo. Los inventores creen que hay una correlación elevada entre el aporte (colección de anticuerpos utilizada para la selección frente a un antígeno) y el resultado (anticuerpos identificados a partir de la colección como específicos para el antígeno) con respecto a las propiedades funcionales sometidas a ensayo. Por lo tanto, las colecciones de la invención comprenden anticuerpos o fragmentos que comprenden, en parte, las mismas secuencias de aminoácidos que las estructuras artificiales sometidas a ensayo, por ejemplo, las regiones estructurales y/o las regiones determinantes de complementariedad. Dado que, en un aspecto, las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos o los ácidos nucleicos que las codifican, de las estructuras artificiales sometidas a ensayo, se cree que las colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos que tienen las mismas propiedades funcionales superiores relacionadas con la capacidad de desarrollo que las estructuras artificiales sometidas a ensayo. Por lo tanto, se espera que los anticuerpos o fragmentos posteriormente seleccionados a partir de las colecciones contra un antígeno, también tengan las mismas propiedades funcionales superiores pertinentes para una capacidad de desarrollo. Esta hipótesis está apoyada por los experimentos y los datos descritos en el Ejemplo 11, véanse las Figuras 37-39, 45-48 y 62. Una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, dieciséis o más, diecisiete o más, dieciocho o más, diecinueve o más, veinte o más, veintiuno o más, veintidós o más, veintitrés o más, veinticuatro o más, veinticinco o más, veintiséis o más, veintisiete o más, veintiocho o más, veintinueve o más, treinta o más, treinta y uno o más, treinta y dos o más, treinta y tres o más, treinta y cuatro o más, treinta y cinco o más, o treinta y seis o más, treinta y siete o más, treinta y ocho o más, treinta y nueve o más, cuarenta o más, cuarenta y uno o más, o cuarenta y dos o más, o cuarenta y tres o más, o cuarenta y cuatro o más, o cuarenta y cinco o más, o cuarenta y seis o más, o cuarenta y siete o más, o cuarenta y ocho o más, o cuarenta y nueve o más, o cincuenta o más, o cincuenta y uno o más, o cincuenta y dos o más, o cincuenta y tres o más, o cincuenta y cuatro parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable de VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/NK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/NK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/NK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/NK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/NL1-51 (SEQ ID NO: 252). Una colección puede comprender anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales, comprenden parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/NK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/NK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/NK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/NK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/NK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO:

207)NK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)NK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)NL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)NK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)NK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)NK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)NK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)NK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)NK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)NK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)NK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)NL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-05 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252). Se describe una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, que consisten o que consisten esencialmente en las parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En realizaciones que comprenden las 54 parejas o un subconjunto de las mismas, se pueden seleccionar parejas adicionales para ser añadidas a la colección, en donde cada pareja de proteínas de la línea germinal añadida comprende las siguientes propiedades:

- i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/l como se determina por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,538 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm,
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab según lo determinado por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS,

iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98% tal como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 HR10/30 y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4,

iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/l como se determina por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,369 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm,

v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1 como se determina por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS, y

vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99% tal como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Tosoh TSK-Gel G3000SWxl y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

La espectrofotometría UV puede realizarse usando el sistema Nanadrop (peqlab, Erlangen, Alemania). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando el termociclador iCycler iQ5 (Biorad). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). La cromatografía de exclusión por tamaño se puede realizar utilizando el sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare).

Las realizaciones de la presente descripción comprenden subconjuntos de las (54) parejas de proteínas de la línea germinal anteriores que tienen una actividad funcional superior, relacionada con la capacidad de desarrollo. En una realización, un subconjunto de parejas de proteínas de la línea germinal (36 de 54) fueron seleccionadas basándose en una comparación de los datos de pruebas de estrés identificados utilizando los métodos descritos en los Ejemplos 9.2.5 (a-d), datos que se muestran en las Figuras 19-24, el Ejemplo 9.2.6 (a-d), datos que se muestran en las figuras 49-54 y en el Ejemplo 9.2.7, puntuación que se muestra en las Figuras 55-60. Los métodos de la prueba de estrés evaluaban las 95 parejas de proteínas de la línea germinal en formato IgG1 con el fin de determinar su capacidad para soportar la exposición al ácido y la agitación con perlas de vidrio. Las 36 parejas de proteínas de la línea germinal, de una realización, se seleccionaron ya que tenían propiedades funcionales superiores adicionales, pertinentes para la capacidad de desarrollo, ya que mostraron una fuerte resistencia al estrés con ácido y por agitación. Las 36 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas en una realización, cumplían todas las actividades funcionales umbrales de las 54, y, además, se puntuaron con o por encima de 1225 en la puntuación acumulada de las pruebas de estrés (como se describe en el Ejemplo 9.2.7), que clasificaba las parejas de proteínas de la línea germinal de acuerdo con las siguientes características: absorción a 320 nm antes y después de la exposición al ácido, radio y % de polidispersidad antes y después de la exposición al ácido, tinción de partículas antes y después de la exposición al ácido, absorción a 320 nm antes y después de la agitación con perlas de vidrio, radio y % de polidispersidad después de la agitación con perlas de vidrio, y tinción de partículas después de la agitación con perlas de vidrio. Las 36 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas en esta realización, tenían valores umbrales iguales o por encima de los siguientes umbrales para cada criterio: a) rendimiento de la expresión Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 98%; f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99% y g) puntuación acumulada de las pruebas de estrés (como se describe en el Ejemplo 9.2.7) de al menos 1225.

Por lo tanto, en una realización, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/

215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En realizaciones que comprenden las 36 parejas o un subconjunto de las mismas, se pueden seleccionar parejas adicionales para ser añadidas a la colección, en donde cada pareja de proteínas de la línea germinal añadida comprende las siguientes propiedades:

- 5 i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/l como se determina por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,538 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm,
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab según lo determinado por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS,
- 10 iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98% tal como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 HR10/30 y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4,
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/l como se determina por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,369 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm,
- 15 v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1 como se determina por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS, y
- vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99% tal como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Tosoh TSK-Gel G3000SWxl y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.
- 20 La espectrofotometría UV puede realizarse usando el sistema Nanadrop (peqlab, Erlangen, Alemania). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando el termociclador iCycler iQ5 (Biorad). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). La cromatografía de exclusión por tamaño se puede realizar utilizando el sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare).
- 25 En realizaciones, una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable
- 30 VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1 - 46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1 -47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1 -47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252). Se describe una colección que comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, dieciséis o más, diecisiete o más, dieciocho o más, diecinueve o más, veinte o más, veintiuno o más, veintidós o más, veintitrés o más, veinticuatro o más, veinticinco o más, veintiséis o más, veintisiete o más, veintiocho o más, veintinueve o más, treinta o más, treinta y uno o más, treinta y dos o más, treinta y tres o más, treinta y cuatro o más, treinta y cinco o más, o treinta y seis de las siguientes parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ
- 55



ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En una realización, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, que consiste en o que consisten esencialmente en las siguientes parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En otra realización, se seleccionaron los umbrales para cada criterio de la siguiente manera: a) rendimiento de la expresión de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 99%; f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99%; g) punto isoeléctrico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.4) de al menos 8,3; y h) puntuación acumulada de las pruebas de estrés (como se describe en el Ejemplo 9.2.7) de al menos 1225.

Por lo tanto, en una realización, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades:

- i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
- iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 99%, determinado por SEC;
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;

- v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1;
- vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC, y
- vii) un punto isoeléctrico en formato IgG1 de al menos 8,3.

En ciertas realizaciones,

- 5 i) el rendimiento de la expresión en formato Fab se determinó por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,538 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm.

En ciertas realizaciones,

- ii) la estabilidad térmica en formato Fab fue determinada por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS.

- 10 En ciertas realizaciones,

- iii) el contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 HR10/30 y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

En ciertas realizaciones,

- 15 iv) el rendimiento de la expresión en formato IgG1 se determinó por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,369 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm.

En ciertas realizaciones,

- v) la estabilidad térmica en formato IgG1 fue determinada por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS.

En ciertas realizaciones,

- 20 vi) el contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Tosoh TSK-Gel G3000SWxl y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

La espectrofotometría UV puede realizarse usando el sistema Nanadrop (peqlab, Erlangen, Alemania). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando el termociclador iCycler iQ5 (Biorad). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). La cromatografía de exclusión por tamaño se puede realizar utilizando el sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare).

- 25 En realizaciones adicionales, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades:

- i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
- 35 iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 99%, determinado por SEC;
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;
- v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1;
- vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC, y
- vii) un punto isoeléctrico en formato IgG1 de al menos 8,3.

- 40 En realizaciones adicionales, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales consisten en o consisten esencialmente en regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades:

- 45

- i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
- iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 99%, determinado por SEC;
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;
- 5 v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1;
- vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC, y
- vii) un punto isoeléctrico en formato IgG1 de al menos 8,3.

Las siguientes parejas de proteínas de la línea germinal (33) tenían los siguientes valores umbrales o superiores: a) rendimiento de la expresión de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 99%; f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99%; g) punto isoeléctrico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.4) de al menos 8,3; y h) puntuación acumulada de las pruebas de estrés (como se describe en el Ejemplo 9.2.7) de al menos 1225, por lo tanto, tienen una actividad funcional superior, relacionada con la capacidad de desarrollo: VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

Por lo tanto, en una realización, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En realizaciones que comprenden las 33 parejas o un subconjunto de las mismas, se pueden seleccionar parejas adicionales para ser añadidas a la colección, en donde cada pareja de proteínas de la línea germinal añadida comprende las siguientes propiedades:

- i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/l como se determina por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,538 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm,
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab según lo determinado por fluorometría de barrido diferencial usando tampón de PBS,
- 5      iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 99% tal como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 HR10/30 y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4,
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/l como se determina por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,369 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm,
- 10      v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1 como se determina por fluorometría de barrido diferencial usando tampón de PBS, y
- vi) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99% tal como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Tosoh TSK-Gel G3000SWxl y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.
- 15      La espectrofotometría UV puede realizarse usando el sistema Nanadrop (peqlab, Erlangen, Alemania). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando el termociclador iCycler iQ5 (Biorad). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). La cromatografía de exclusión por tamaño se puede realizar utilizando el sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare).
- 20      En realizaciones que comprenden las 33 parejas o un subconjunto de las mismas, se pueden seleccionar parejas adicionales para ser añadidas a la colección, en donde cada pareja de proteínas de la línea germinal añadida comprende además la siguiente propiedad:
- vii) un punto isoeléctrico en formato IgG1 de al menos 8,3.

En una realización adicional, las parejas se añaden a una colección a pesar de que las parejas mismas no cumplieran todos los valores umbrales dentro de cada criterio, pero se añadieron a las colecciones con el fin de aumentar la diversidad. En una realización, la colección de 33 parejas de proteínas de la línea germinal comprende además:

25      VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); y VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256). En esta realización, la colección comprende (36 parejas): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

40      45

En realizaciones, las colecciones que comprenden cualquier cantidad de estas parejas de proteínas de la línea germinal o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales podrían utilizarse para identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos con capacidad de desarrollo contra cualquier antígeno.

En algunas realizaciones, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, dieciséis o más, diecisiete o más, dieciocho o más, diecinueve o más, veinte o más, veintiuno o más, veintidós o más, veintitrés o más, veinticuatro o más, veinticinco o más, veintiséis o más, veintisiete o más,

50      55

veintiocho o más, veintinueve o más, treinta o más, treinta y uno o más, treinta y dos o más, treinta y tres o más, parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable seleccionadas a partir del grupo que consiste en VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En una realización, una colección comprende anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

Una realización comprende una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, que consisten en o que consisten esencialmente en las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

Un aspecto adicional de la presente invención es la capacidad de las colecciones para ser útiles en la identificación de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier agente inmunógeno. Por lo tanto, las colecciones comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y regiones estructurales de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de al menos dos parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos tres parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos cuatro parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos cinco parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos seis parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos siete parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos ocho parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos nueve parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos diez parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos once parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos doce parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos trece parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos catorce parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos quince parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos dieciséis parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos diecisiete parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos dieciocho parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos diecinueve parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos veinte parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 21 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 22 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 23 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 24 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 25 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 26 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 27 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 28 proteínas de la línea germinal de cadena pesada variable diferente; al menos 29 secuencias de parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 30 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 31 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 32 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 33 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 34 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 35 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 36 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 37 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 38 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 39 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 40 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 41 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 42 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 43 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 44 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 45 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 46 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 47 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 48 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 49 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 50 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 51 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 52 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 53 parejas de proteínas de la línea germinal diferentes; al menos 54 diferentes parejas de proteínas de la línea germinal.

Como un bajo potencial de inmunogenicidad en los seres humanos es un objetivo para los anticuerpos terapéuticos, en un aspecto, las colecciones comprenden regiones estructurales que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal o ácidos nucleicos que las codifican. Además, con el fin de conservar un bajo riesgo de inmunogenicidad, se pueden usar regiones determinantes de la complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En una realización, las colecciones comprenden anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de la regiones determinantes de complementariedad de las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 25-33. Más específicamente, en una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones CDR1 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de cadena pesada variable y/o de cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región CDR1 de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 25, 28 y 31, y las SEQ ID NOs: 204-265 correspondientes. En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones HCDR1 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región HCDR1 de las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables se representan en la Figura 25 y las SEQ ID NOs: 204-229 correspondientes. En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones LCDR1 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región LCDR1 de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 28 y 31 y las SEQ ID NOs: 230-265 correspondientes. En una realización adicional, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones CDR2 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de cadena pesada variable y/o de cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región CDR2 de las

cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 26, 29 y 32, y las SEQ ID NOs: 204-265 correspondientes. En una realización adicional, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones HCDR2 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región HCDR2 de las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables se representan en la Figura 26 y las SEQ ID NOs: 204-229 correspondientes. En una realización adicional, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones LCDR2 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de cadena pesada variable y de cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región LCDR2 de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 29 y 32 y las SEQ ID NOs: 230-265 correspondientes.

Un aspecto de la descripción incluye la modificación de regiones determinantes de complementariedad de la línea germinal para eliminar posibles sitios de modificación postraducciona (PTMs). Ejemplos de regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada variable modificadas para eliminar PTMs, se muestran en las Figuras 34-36. En un aspecto, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden modificaciones de aminoácidos que eliminan potenciales sitios de modificación postraduccionales. En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de regiones determinantes de complementariedad o secuencias ácidos nucleicos que codifican las mismas representadas en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. En una realización adicional, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones HCDR1 que comprenden la HCDR1 o ácidos nucleicos que codifican la misma representadas en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. Las secuencias de aminoácidos de las HCDR1s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 266-278. Las secuencias de ácidos nucleicos de HCDR1s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 279-291. En una realización adicional, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones HCDR2 que comprenden las regiones HCDR2 o ácidos nucleicos que las codifican representadas en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. Las secuencias de aminoácidos de las HCDR2s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 266-278. Las secuencias de ácidos nucleicos de las HCDR2s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 279-291.

Un aspecto de la descripción incluye la utilización de secuencias de FR4 de la línea germinal en las colecciones. En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región FR4 seleccionada a partir del grupo que consiste en: JH4 (SEQ ID NO: 293), Jk1 (SEQ ID NO: 297) y Jλ2/3 (SEQ ID NO: 301). En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región JH4 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de JH4 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 293) y (SEQ ID NO: 295). La secuencia de ácido nucleico de JH4 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 292) y (SEQ ID NO: 294). En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región Jk1 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de Jk1 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 297). La secuencia de ácido nucleico de Jk1 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 296), (SEQ ID NO: 298) y (SEQ ID NO: 299). En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región Jλ2/3 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de Jλ2/3 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 301). La secuencia de ácido nucleico de Jλ2/3 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 300), (SEQ ID NO: 302) y (SEQ ID NO: 303).

En un aspecto, con el fin de mejorar la capacidad de identificar anticuerpos o un fragmento de los mismos contra cualquier antígeno, las colecciones comprenden una región CDR3 diversificada. En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región HCDR3 diversificada. En una realización, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región LCDR3 diversificada.

En otro aspecto, con el fin de mejorar la capacidad de identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos contra cualquier antígeno, las colecciones comprenden al menos  $1 \times 10^4$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^5$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o

- fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^6$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^7$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^8$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^9$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^{10}$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales o al menos  $1 \times 10^{11}$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales.
- En una realización, las colecciones comprenden anticuerpos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos seleccionados a partir del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM e IgD humanas. En una realización, las colecciones comprenden fragmentos de anticuerpos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales fragmentos seleccionados a partir del grupo que consiste en Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv y scFv.
- En realizaciones, los dominios constantes de la cadena pesada de IgG de los anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las Figuras 41A-B (SEQ ID NO: 305). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena pesada de IgG de los anticuerpos de la colección comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en las Figuras 41A-B (SEQ ID NO: 304). En realizaciones, los dominios constantes de la cadena pesada de Fab de los fragmentos de anticuerpo de las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 42 (SEQ ID NO: 307). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena pesada de Fab de los anticuerpos de la colección comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en la Figura 42 (SEQ ID NO: 306). En realizaciones, los dominios constantes de la cadena ligera kappa de IgG (SEQ ID NO: 309) y/o Fab (SEQ ID NO: 311) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 43. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena ligera kappa de IgG (SEQ ID NO: 308) y/o Fab (SEQ ID NO: 310) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en la Figura 43. En realizaciones, los dominios constantes de la cadena ligera lambda de IgG (SEQ ID NO: 313) y/o Fab (SEQ ID NO: 315) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 44. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena ligera lambda de IgG (SEQ ID NO: 312) y/o Fab (SEQ ID NO: 314) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en la Figura 44.
- Un aspecto comprende, un vector que comprende las colecciones de ácidos nucleicos descritas en este documento. En una realización, el vector comprende un vector de presentación. En una realización, el vector comprende un vector fagémido, un vector de presentación en levadura o de presentación en mamífero. Un aspecto es una célula hospedadora recombinante que comprende los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o un vector descrito en este documento. En una realización, el hospedador recombinante es procariota o eucariota. En una realización, la célula hospedadora recombinante es *E. coli*, de mamífero o de levadura.

### Métodos de preparación

- Un aspecto comprende métodos para producir las colecciones descritas en este documento.
- Un aspecto comprende, un método para producir una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, que comprende
- a) la identificación de parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano;
  - b) someter a ensayo las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable identificadas en la etapa a) para estudiar las siguientes propiedades:
    - i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
    - ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
    - iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98%, determinado por SEC;
    - iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;
    - v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1; y
    - vii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC; y



c) generar una colección, en la que sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal que cumplen las propiedades de la etapa b).

En ciertas realizaciones del método,

i) el rendimiento de la expresión en formato Fab se determinó por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,538 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm.

En ciertas realizaciones,

ii) la estabilidad térmica en formato Fab fue determinada por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS.

En ciertas realizaciones,

iii) el contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 HR10/30 y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

En ciertas realizaciones,

iv) el rendimiento de la expresión en formato IgG1 se determinó por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,369 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm.

En ciertas realizaciones,

v) la estabilidad térmica en formato IgG1 fue determinada por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS.

En ciertas realizaciones,

vi) el contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Tosoh TSK-Gel G3000SWxl y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

La espectrofotometría UV puede realizarse usando el sistema Nanadrop (peqlab, Erlangen, Alemania). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando el termociclador iCycler iQ5 (Biorad). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). La cromatografía de exclusión por tamaño se puede realizar utilizando el sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare).

En una realización, la etapa a) comprende adicionalmente las etapas

aa) aislar linfocitos B humanos a partir de una muestra;

ab) generar ADNc a partir de los linfocitos B;

ac) amplificar con PCR los ADNc de los linfocitos B;

ad) secuenciar los productos de la PCR;

ae) identificar los genes de la línea germinal de cada producto de la PCR.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos que codifican el ADN de cada linfocito B se aíslan y se amplifican, por ejemplo, la cadena pesada y ligera se aíslan físicamente en una reacción de PCR. El ADN se secuencia preferiblemente. El ADN secuenciado puede ser ADNc generado a partir del ARNm de linfocitos B. La extracción del ARNm a partir de células eucariotas, tales como linfocitos B, es un procedimiento tecnológico bien conocido. Existen numerosos protocolos y están disponibles kits comerciales. Tal como el sistema de aislamiento de ARNm PolyATtract® (Promega, Madison, WI, EE.UU.) o varios kits de RNeasy y Oligotex DirectmRNA (ambos de Qiagen, Hilden, Alemania). Muchas de estas técnicas hacen uso de la cola poliA del ARNm eucariota, por ejemplo, a través de una purificación por afinidad de matrices de oligo (dT), tales como celulosa oligo (dT).

El ADNc puede amplificarse selectivamente a partir del ARNm aislado mediante una transcripción inversa, usando cebadores específicos, seguida de PCR convencional. Los cebadores específicos se utilizan para amplificar ácidos nucleicos del dominio variable de la cadena pesada y ligera. Véanse, Cancer Surv. 1997; 30:21-44, J Clin. Pathol. 1994; 47:493-6, J. Clin. Pathol. 1990; 43:888-90 o Mol. Pathol. 2002 Abril; 55(2): 98-101. El ADN que codifica los dominios de la cadena variable y ligera a partir de un linfocito B, se mantiene junto de manera que se puede identificar el apareamiento de la clase de cadena pesada y ligera del dominio variable. Las técnicas para el aislamiento de

ácidos nucleicos que codifican emparejamientos de dominios variables procedentes de linfocitos B individuales, son bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO01/92291; WO92/15678; WO93/03151, WO2005/042 774; Mullinax RL et al., 1992 *Biotechniques* 12:6 864-868; Chapal, N. et al. 1997 *Biotechniques* 23, 518-524; Embleton MJ et al., 1992 *Nucleic Acids Res.* 20:15, 3831-3837; Coronella, J.A. et al. 2000 *Nucleic Acids Res.* 28:20, E85; Thirion S et al., 1996 *European Journal of Cancer Prevention* 5:6 507-511; y Wang, X et al. 2000 *J. Immunol. Methods* 20, 217-22525.

Preferiblemente, se secuencian el ADN a partir de cada uno de los linfocitos B. Existen diversas compañías que son capaces de secuenciar genomas enteros, tales como Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, MA, EE.UU.). Con su tecnología True individual Molecule Sequencing®, Helicos es capaz de secuenciar directamente moléculas individuales de ADN o ARN con velocidad y eficacia elevadas. Otras compañías capaces de realizar trabajos similares con secuencias incluyen Illumina (San Diego, CA, EE.UU., Solexa system) y Roche (Basilea, CH; 454 system). No son necesarias etapas de clonación antes de la secuenciación.

En otro aspecto, la descripción permite métodos para identificar la familia de la línea germinal de las parejas de dominio variable de cadena pesada y ligera presentes en el repertorio inmune. En todos los anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede rastrear el origen de su familia de la línea germinal usando métodos conocidos por un experto en la técnica. Mediante el análisis de la secuencia de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo, la familia de la línea germinal tanto de VH como de VL se puede determinar por métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, Wildt et al., (1999) muestrearon linfocitos B procedentes de 3 pacientes e identificaron 365 emparejamientos de la clase VH y VL. El ARN de cada linfocito B se utilizó para la síntesis de ADNc y el ADNc que codificaba las regiones VH y VL se amplificó mediante PCR y se secuenció. Como se muestra en la Fig. 1 de Wildt, ciertas clases de VH y VLs se emparejan con más frecuencia que otras, por ejemplo, VH3-8 con Vk3-1, Vk3-19, Vk4-1, VL2-3, or VL1-2, y VH3-9 con Vk3-1, Vk3-3 o VL1-5.

En una realización, la etapa b) comprende además las etapas

ba) sintetizar ADN que codifica anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que representan las parejas presentes en el repertorio inmune humano;

bb) expresar las parejas de proteínas de la línea germinal sintetizadas en ba); y

bc) someter a ensayo las parejas de proteínas de la línea germinal de bb) para estudiar cada una de las propiedades.

En un aspecto del método, los ácidos nucleicos que codifican las colecciones de anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se sintetizan y se expresan en colecciones que se pueden utilizar para seleccionar frente a un antígeno. En esta realización, el método comprende la etapa c), en donde la etapa c) comprende las etapas ca) de síntesis de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos; cb) de clonación de los ácidos nucleicos en un vector; cc) de expresión de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.

En otra realización del método, los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable de VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En otra realización del método, los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de cadena pesada

- variable y cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal que comprenden dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, dieciséis o más, diecisiete o más, dieciocho o más, diecinueve o más, veinte o más, veintiuno o más, veintidós o más, veintitrés o más, veinticuatro o más, veinticinco o más, veintiséis o más, veintisiete o más, veintiocho o más, veintinueve o más, treinta o más, treinta y uno o más, treinta y dos o más, treinta y tres o más, treinta y cuatro o más, treinta y cinco o más, treinta y seis o más, treinta y siete o más, treinta y ocho o más, treinta y nueve o más, cuarenta o más, o cuarenta y uno o más, o cuarenta y dos o más, cuarenta y tres o más, cuarenta y cuatro o más, o cuarenta y cinco o más, o cuarenta y seis o más, o cuarenta y siete o más, o cuarenta y ocho o más, o cuarenta y nueve o más, o cincuenta o más, o cincuenta y uno o más, o cincuenta y dos o más, o cincuenta y tres o más, o cincuenta y cuatro parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable seleccionadas a partir del grupo que consiste en VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).
- En realizaciones adicionales del método, sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada uno del o de los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades:
- i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
  - ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
  - iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 99%, determinado por SEC;
  - iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;
  - v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1; y
  - vii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC
  - viii) un punto isoeléctrico en formato IgG1 de al menos 8,3.

En esta realización del método, los anticuerpos o los fragmentos funcionales comprenden parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable de VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238);

238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En una realización adicional del método, los anticuerpos o los fragmentos funcionales comprenden parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden además las secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable de VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); y VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256). En esta realización del método, la colección comprende (36 parejas): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

### Métodos de uso

Un aspecto comprende métodos para el uso de las colecciones descritas en este documento para identificar anticuerpos o fragmentos específicos para un antígeno.

Un aspecto de la descripción comprende un método para identificar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para un antígeno, que comprende:

(a) poner en contacto el antígeno con una colección de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, en donde sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada anticuerpo o anticuerpos o fragmentos funcionales de la colección comprenden parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden las siguientes propiedades:

i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;

ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;

iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 98%, determinado por SEC;

iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;

v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1; y

vii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC, y

(b) seleccionar uno o varios anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a dicho antígeno.

En ciertas realizaciones,

i) el rendimiento de la expresión en formato Fab se determinó por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,538 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm.

En ciertas realizaciones,

5 ii) la estabilidad térmica en formato Fab fue determinada por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS.

En ciertas realizaciones,

iii) el contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 HR10/30 y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

10 En ciertas realizaciones,

iv) el rendimiento de la expresión en formato IgG1 se determinó por espectrofotometría UV utilizando un coeficiente de extinción de 1,369 ml/mg y la medición de la absorbancia a 280 nm.

En ciertas realizaciones,

15 v) la estabilidad térmica en formato IgG1 fue determinada por fluorometría de barrido diferencial usando tampón PBS.

En ciertas realizaciones,

vi) el contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Tosoh TSK-Gel G3000SWxl y tampón D-PBS de Gibco a pH 7,4.

20 La espectrofotometría UV puede realizarse usando el sistema Nanadrop (peqlab, Erlangen, Alemania). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando el termociclador iCycler iQ5 (Biorad). La fluorometría de barrido diferencial se puede realizar usando D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). La cromatografía de exclusión por tamaño se puede realizar utilizando el sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare).

25 En una realización del método, las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

45 En una realización del método, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, dieciséis o más, diecisiete o más, dieciocho o más, diecinueve o más, veinte o más, veintiuno o más, veintidós o más, veintitrés o más, veinticuatro o más, veinticinco o más, veintiséis o más, veintisiete o más, veintiocho o más, veintinueve o más, treinta o más, treinta y uno o más, treinta y dos o más, treinta y tres o más, treinta y cuatro o más, treinta y cinco o más, treinta y seis o más, treinta y siete o más, treinta y ocho o más, treinta y nueve o más, cuarenta o más, cuarenta y uno o más, cuarenta y dos o más, cuarenta y tres o más, cuarenta y cuatro o más, cuarenta y cinco o más, cuarenta y seis o más, cuarenta y siete o más, cuarenta y ocho o más, cuarenta y nueve o más, cincuenta o más, cincuenta y uno o más, cincuenta y dos o más, cincuenta y tres o más, cincuenta y cuatro parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable seleccionadas a partir del grupo que consiste en las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable de VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VH3-07 (SEQ ID NO: 207); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VH3-11 (SEQ ID NO: 208); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VH3-15 (SEQ ID NO: 209); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VH5-51 (SEQ ID NO: 215); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VH6-1 (SEQ ID NO: 216).

NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1 -51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1 -39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1 -51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/NK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/NK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En una realización del método, sustancialmente todos o al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o cada uno del o de los anticuerpos o fragmentos funcionales comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades:

- i) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 2,5 mg/L;
- ii) una estabilidad térmica a 70°C o superior en formato Fab;
- iii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato Fab de al menos 99%, determinado por SEC;
- iv) un rendimiento de la expresión en formato IgG1 de al menos 30 mg/L;
- v) una estabilidad térmica a 73°C o superior en formato IgG1;
- vii) un contenido monomérico (% de monómero) en formato IgG1 de al menos 99%, determinado por SEC; y
- viii) un punto isoeléctrico en formato IgG1 de al menos 8,3.

En esta realización del método, las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1 -51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1 -12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En una realización adicional del método, las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de

la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas adicionalmente a partir de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); y VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256). En esta realización, una colección comprende (36 parejas): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

#### Aspectos de los métodos

En otros aspectos de los métodos descritos en el presente documento, las colecciones comprenden anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 25-33. Más específicamente, en una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones CDR1 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de la región CDR1 de las cadenas pesadas variables y de las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 25, 28 y 31 y las correspondientes SEQ ID NOs: 204-265. En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones HCDR1 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región HCDR1 de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 25 y las correspondientes SEQ ID NOs: 204-229. En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones LCDR1 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región LCDR1 de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 28 y 31 y las correspondientes SEQ ID NOs: 230-265. En una realización adicional del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones CDR2 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región CDR2 de las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 26, 29 y 32 y las correspondientes SEQ ID NOs: 204-265. En una realización adicional del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones HCDR2 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región HCDR2 de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 26 y las correspondientes SEQ ID NOs: 204-229. En una realización adicional del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones LCDR2 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región LCDR2 de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 29 y 32 y las correspondientes SEQ ID NOs: 230-265.

En realizaciones del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o áci-

dos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden modificaciones de aminoácidos que eliminan sitios de modificación postraduccionales potenciales. En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden las secuencias de regiones determinantes de complementariedad o secuencias de ácidos nucleicos que las codifican representadas en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. En una realización adicional del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones HCDR1 que comprenden la HCDR1 o ácidos nucleicos que la codifican representados en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. Las secuencias de aminoácidos de las HCDR1s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 266-278. Las secuencias de ácidos nucleicos de las HCDR1s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 279-291. En una realización adicional del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden regiones HCDR2 que comprenden las regiones HCDR2 o ácidos nucleicos que las codifican representados en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. Las secuencias de aminoácidos de las HCDR2s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 266-278. Las secuencias de ácidos nucleicos de las HCDR2s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 279-291.

En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región FR4 seleccionada a partir del grupo que consiste en: JH4 (SEQ ID NO: 293), Jk1 (SEQ ID NO: 297) y Jλ2/3 (SEQ ID NO: 301). En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región JH4 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de JH4 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 293) y (SEQ ID NO: 295). La secuencia de ácido nucleico de JH4 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 292) y (SEQ ID NO: 294). En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región Jk1 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de Jk1 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 297). La secuencia de ácido nucleico de Jk1 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 296), (SEQ ID NO: 298) y (SEQ ID NO: 299). En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región Jλ2/3 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de Jλ2/3 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 301). La secuencia de ácido nucleico de Jλ2/3 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 300), (SEQ ID NO: 302) y (SEQ ID NO: 303).

En un aspecto, con el fin de mejorar la capacidad de identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos contra cualquier antígeno, las colecciones comprenden una región CDR3 diversificada. En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región HCDR3 diversificada. En una realización del método, una colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales que comprenden una región LCDR3 diversificada.

En otro aspecto, con el fin de mejorar la capacidad de identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos contra cualquier antígeno, las colecciones del método comprenden al menos  $1 \times 10^4$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^5$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales de, al menos  $1 \times 10^6$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^7$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^8$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^9$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^{10}$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales, al menos  $1 \times 10^{11}$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos o fragmentos funcionales.

En una realización del método, las colecciones comprenden anticuerpos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales anticuerpos seleccionados a partir del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM e IgD humanas. En una realización del método, las colecciones comprenden fragmentos de anticuerpos o ácidos nucleicos sintéticos que codifican tales fragmentos seleccionados a partir del grupo que consiste en Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv y scFv.



En realizaciones del método, los dominios constantes de la cadena pesada de IgG de los anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las Figuras 41A-B (SEQ ID NO: 305). En otras realizaciones del método, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena pesada de IgG de los anticuerpos de la colección comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en las Figuras 41A-B (SEQ ID NO: 304). En realizaciones, los dominios constantes de la cadena pesada de Fab de los fragmentos de anticuerpo de las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 42 (SEQ ID NO: 307). En otras realizaciones del método, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena pesada de Fab de los anticuerpos de la colección comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en la Figura 42 (SEQ ID NO: 306). En realizaciones del método, los dominios constantes de la cadena ligera kappa de IgG (SEQ ID NO: 309) y/o Fab (SEQ ID NO: 311) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 43. En otras realizaciones del método, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena ligera kappa de IgG (SEQ ID NO: 308) y/o Fab (SEQ ID NO: 310) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en la Figura 43. En realizaciones del método, los dominios constantes de la cadena ligera lambda de IgG (SEQ ID NO: 313) y/o Fab (SEQ ID NO: 315) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 44. En otras realizaciones del método, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena ligera lambda de IgG (SEQ ID NO: 312) y/o Fab (SEQ ID NO: 314) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las colecciones comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en la Figura 44.

## Anticuerpos de la invención

En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico que codifica tal anticuerpo sintético o fragmentos funcionales, en donde el anticuerpo o el fragmento funcional comprende una pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de la pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la respectiva pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde la secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable se representa en las Figuras 25-33. Más específicamente, en una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región CDR1 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de la respectiva pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR1 de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables se representan en las Figuras 25, 28 y 31 y las correspondientes SEQ ID NOs: 204-265. En una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codi-

fica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región HCDR1 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de la respectiva pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos de la región HCDR1 de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable se representan en la Figura 25 y las correspondientes SEQ ID NOs: 204-229. En una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región LCDR1 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de la respectiva pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos de la región LCDR1 de las cadenas pesadas variables y cadena ligera variable se representan en las Figuras 28 y 31 y las correspondientes SEQ ID NOs: 230-265. En una realización adicional, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región CDR2 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de la respectiva pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos de la región CDR2 de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable se representan en las Figuras 26, 29 y 32, y las correspondientes SEQ ID NOs: 204-265. En una realización adicional, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región HCDR2 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de la respectiva pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos de la región HCDR2 de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable se representan en la Figura 26 y las correspondientes SEQ ID NOs: 204-229. En una realización adicional, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región LCDR2 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de la respectiva pareja de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las secuencias de aminoácidos de la región LCDR2 de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable se representan en las Figuras 29 y 32 y las correspondientes SEQ ID NOs: 230-265.

Un aspecto de la descripción incluye modificar las regiones determinantes de complementariedad de la línea germinal para eliminar posibles sitios de modificación postraducciona (PTMs). Ejemplos de regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada variable modificadas para eliminar PTMs, se muestran en las Figuras 34-36. En un aspecto, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden modificaciones de aminoácidos que eliminan potenciales sitios de modificación postraducciona. En una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden las secuencias de la región determinante de complementariedad o secuencias de ácidos nucleicos que la codifican representadas en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. En una realización adicional, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región HCDR1 que comprende la HCDR1 o ácidos nucleicos que la codifican representados en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. Las secuencias de aminoácidos de la HCDR1 con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 266-278. Las secuencias de ácidos nucleicos de la HCDR1 con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 279-291. En una realización adicional, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o un ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región HCDR2 que comprende la región HCDR2 o ácidos nucleicos que la codifican representados en las Figuras 34-36 de la respectiva cadena pesada variable. Las secuencias de aminoácidos de las HCDR2s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 266-278. Las secuencias de ácidos nucleicos de las HCDR2s con pocos PTMs se representan en SEQ ID NOs: 279-291.

Un aspecto de la descripción incluye la utilización de secuencias de FR4 de la línea germinal. En una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región FR4 seleccionada a partir del grupo que consiste en: JH4 (SEQ ID NO: 293), Jk1 (SEQ ID NO: 297) y Jλ2/3 (SEQ ID NO: 301). En una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región JH4 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de JH4 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 293) y (SEQ ID NO: 295). La secuencia de ácido nucleico de JH4 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 292) y (SEQ ID NO: 294). En una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región Jk1 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de Jk1 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 297). La secuencia de ácido nucleico de Jk1 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 296), (SEQ ID NO: 298) y (SEQ ID NO: 299). En una realización, el anticuerpo sintético o un fragmento funcional del mismo o ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una región Jλ2/3 FR4 de la línea germinal, cuya secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se representa en la Figura 40. La secuencia de aminoácidos de Jλ2/3 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 301). La secuencia de ácido nucleico de Jλ2/3 FR4 se representa en (SEQ ID NO: 300), (SEQ ID NO: 302) y (SEQ ID NO: 303).

En una realización, el anticuerpo sintético o ácido nucleico sintético que codifica tal anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM e IgD humanas. En una realización, el fragmento de

anticuerpo sintético o el ácido nucleico sintético que codifica tal fragmento de anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste en Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv y scFv.

En realizaciones, el dominio constante de la cadena pesada de IgG del anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en las Figuras 41A-B (SEQ ID NO: 305). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena pesada de IgG del anticuerpo comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en las Figuras 41A-B (SEQ ID NO: 304). En realizaciones, el dominio constante de la cadena pesada de Fab de los fragmentos de anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 42 (SEQ ID NO: 307). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican el dominio constante de la cadena pesada de Fab del fragmento de anticuerpo comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en la Figura 42 (SEQ ID NO: 306). En realizaciones, los dominios constantes de la cadena ligera kappa de IgG (SEQ ID NO: 309) y/o Fab (SEQ ID NO: 311) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 43. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes de la cadena ligera lambda de IgG (SEQ ID NO: 312) y/o Fab (SEQ ID NO: 314) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en la Figura 44.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Generación de sitios de restricción en el extremo C-terminal de una secuencia señal procariota y una secuencia líder humana, proporcionando regiones FR1 de la línea germinal completas

En un aspecto, la presente descripción describe colecciones de anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden regiones estructurales que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, específicamente FR1. Se espera que al tener secuencias de la línea germinal se reduzca el riesgo de inmunogenicidad de los anticuerpos cuando se administran en seres humanos. Sin embargo, se deben emplear sitios de restricción compatibles, con el fin de permitir una clonación estándar de los ácidos nucleicos que codifican las colecciones de anticuerpos en vectores de presentación y/o vectores de expresión, de modo que los anticuerpos se puedan escrutar en busca de agentes inmunógenos. En el pasado, los sitios de restricción utilizados para la clonación se encontraban a menudo dentro de las regiones estructurales, modificando así la secuencia de ácido nucleico y/o de aminoácidos, diferenciándola de la línea germinal. Con el fin de garantizar que al menos la región estructural 1 (FR1) de cada uno de los anticuerpos de la presente descripción conserva una secuencia proteica de la línea germinal, no debería haber ningún sitio de restricción dentro de FR1 que pudiera conducir a desviaciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción es la incorporación de un sitio de restricción idéntico o al menos compatible dentro del extremo C-terminal de secuencias señal procariotas y secuencias líder humanas, específicamente dentro de los tres residuos C-terminales. Adicionalmente, una secuencia señal procariota y una secuencia líder humana que comprenden un sitio de restricción idéntico o compatible, deben ser funcionales y permitir una buena presentación y rendimiento de la expresión de los anticuerpos o fragmentos de los mismos, tanto en sistemas de expresión procariotas como de mamíferos.

La Fig. 1 muestra los sitios de restricción seleccionados y sus posiciones correspondientes. El sitio de restricción de NheI (VLA) se seleccionó para incorporarlo en las secuencias señal de la cadena pesada procariotas (phoA). Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la secuencia señal phoA de tipo silvestre y la secuencia señal phoA de NheI (VLA) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1:

Secuencia señal phoA de E. coli de tipo silvestre (la secuencia de aminoácidos C-terminal desde la posición -3 a -1 es TKA sin sitio de restricción):			
M K Q S T I A L A L L P L L F T P V T K A			
ATGAAACAGAGCACCATTGCCCTGGCCCTGCTGCCGCTGCTGTTTACCCAGTGACCAAA			
GCC			
(SEQ ID NOS 8 y 7, respectivamente, por orden de aparición)			
Extremo C-terminal de phoA de tipo silvestre	T	K	A
	ACC	AAA	GCC
Secuencia señal de phoA de E. coli modificada con VLA C-terminal y sitio de restricción NheI (= GCTAGC):			

M K Q S T I A L A L L P L L F T P V V L A  
 ATGAAACAGAGCACCATTGCCCTGGCCCTGCTGCCGCTGCTGTTTACCCCAGTGGTGCTA  
GCC

(SEQ ID NOS 10 y 9, respectivamente, por orden de aparición)

El sitio de restricción de NdeI (AYA) seleccionó para incorporarlo en las secuencias señal de kappa y lambda procariotas (ompA). Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la secuencia señal ompA de tipo silvestre y la secuencia señal ompA modificada con NdeI (AYA) se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2:

Secuencia señal ompA de E. coli de tipo silvestre (la secuencia de aminoácidos C-terminal desde la posición -3 a -1 es AQA sin sitio de restricción):

M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q A  
 ATGAAAAAAACCGCCATTGCCATTGCCGTGGCCCTGGCAGGCTTTGCCACCGTGGCGCAG  
 GCC

(SEQ ID NOS 12 y 11, respectivamente, por orden de aparición)

Extremo C-terminal de ompA de tipo silvestre	A	Q	A
	GCG	CAG	GCC

Secuencia señal ompA de E. coli modificada con AYA C-terminal y sitio de restricción NheI (= CATATG):

M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Y A  
 ATGAAAAAAACCGCCATTGCCATTGCCGTGGCCCTGGCAGGCTTTGCCACCGTGGCATAT  
GCC

Alternativamente la secuencia de ADN incluye

ATGAAAAAAACCGCCATTGCCATTGCCGTGGCCCTGGCAGGCTTTGCCACCGTGGCATAT  
GCG

(SEQ ID NOS 14, 13 y 15 respectivamente, por orden de aparición)

10

Con el fin de permitir un cambio sencillo del formato Fab expresado en E. coli al formato IgG expresado en mamífero, se generaron las secuencias líder humanas para la cadena ligera de IgG (líder de kappa humana) y la cadena pesada de IgG (líder de la cadena pesada humana) para que tuvieran los mismos sitios de restricción que los extremos C-terminales de las secuencias señal ompA (NdeI (AYA)) y phoA (NheI (VLA)). Las secuencias líder de la cadena pesada humana, y las secuencias líder de kappa humana de tipo silvestre y modificadas, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Líder de la cadena pesada

A)

Líder de la cadena pesada humana de tipo silvestre (la secuencia de aminoácidos C-terminal desde la posición -3 a -1 es VLS sin sitio de restricción):

M K H L W F F L L L V A A P R W V L S  
 ATGAAACACCTGTGGTTCTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCC

(SEQ ID NOS 17 y 16, respectivamente, por orden de aparición)			
Extremo C-terminal del líder de la cadena pesada de tipo silvestre	V	L	S
	GTC	CTG	TCC
B)			
Líder de la cadena pesada humana modificada con VLA C-terminal y sitio de restricción NheI (= GCTAGC)			
M K H L W F F L L L V A A P R W V L A ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCCGGTGGGT <b>GCTAGCC</b>			
(SEQ ID NOS 19 y 18, respectivamente, por orden de aparición)			
C)			
Líder de kappa humana de tipo silvestre (la secuencia de aminoácidos C-terminal desde la posición -3 a -1 es AYG sin sitio de restricción):			
M V L Q T Q V F I S L L L W I S G A Y G ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG			
(SEQ ID NOS 21 y 20, respectivamente, por orden de aparición)			
Extremo C-terminal del líder de kappa	A	Y	G
	GCC	TAC	GGG
D)			
Líder de kappa humana modificado con AYA C-terminal y sitio de restricción NdeI (= CATATG):			
M V L Q T Q V F I S L L L W I S G A Y A ATGGTGCTCCAGACCCAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCG <b>CATATGCG</b>			
(SEQ ID NOS 23 y 22, respectivamente, por orden de aparición)			

Las secuencias señal procariotas y las secuencias líder humanas modificadas seleccionadas (a) dan lugar a rendimientos elevados de proteína Fab e IgG de acuerdo con el sistema de vector utilizado, (b) proporcionan una compatibilidad total para cambiar entre los formatos de anticuerpo, vectores y sistemas de expresión entre sistemas procariotas y de mamífero y (c) se encuentran en las secuencias señal/líder conservando de este modo las secuencias de la línea germinal completas de FR1.

#### Ejemplo 2: Identificación de las parejas más abundantes de VH/VL en el repertorio humano

En su sentido más general, los inventores tuvieron la idea de que puede ser ventajosa una colección de anticuerpos que imite el sistema inmune humano de forma esencial. Los inventores trabajaron en su hipótesis de que las parejas de genes de la línea germinal de cadena pesada variable y la cadena ligera variable que se expresaban de forma abundante en el repertorio inmune humano, probablemente tienen propiedades biofísicas favorables que conducirán a un desarrollo clínico más eficiente y un aumento de la seguridad y la eficacia de los anticuerpos resultantes en pacientes. Para someter a ensayo esta hipótesis, la primera etapa era identificar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable expresadas de forma prominente en el repertorio inmune humano.

#### Ejemplo 2.1: Determinación del uso de los genes de la línea germinal de las parejas VH/VL

Con el fin de identificar las parejas de genes de la línea germinal de VH/VL expresadas predominantemente del repertorio inmune humano, se analizaron los datos disponibles públicamente y se tomaron muestras de linfocitos B humanos. Como primera etapa, se revisaron los datos disponibles públicamente para identificar artículos que describían las parejas de genes de la línea germinal de VH/VL aisladas a partir de linfocitos B humanos. Como se ha mencionado, muchas bases de datos disponibles públicamente proporcionan secuencias de anticuerpos, sin embargo, muchas proporcionan solo las secuencias del dominio variable, VH o VL, pero rara vez proporcionan la unión de

parejas de genes de la línea germinal VH/VL. Se identificaron los siguientes artículos y se analizaron en detalle: Wardemann H. et al. (2003) Science 301, 1374-1377 y todas las tablas complementarias; Yurasov S. et al. (2005) J. Exp. Med. 201, 703-712 y todas las tablas complementarias; Tsuiji M. et al. (2006) J. Exp. Med. 203, 393-401 y todas las tablas complementarias; Yurasov S. et al. (2006) J. Exp. Med. 203, 2255-2262 y todas las tablas complementarias; Tiller T. et al. (2007) Immunity 26, 205-213 y todas las tablas complementarias, y Mietzner B. et al. (2008) PNAS 105, 9727-9732 y todas las tablas complementarias, todos ellos se incorporan como referencia en su totalidad. Se identificaron datos adicionales de parejas de VH/VL a partir de una muestra de linfocitos B humanos, como se describe a continuación.

#### Ejemplo 2.2: Determinación del uso de genes de parejas de VH/VL procedentes de una muestra humana

- 10 Con el fin de obtener datos adicionales del uso de parejas de genes de la línea germinal VH/VL, se aislaron PBMCs de un hospedador humano. Las PBMCs se clasificaron, los ADNc de los linfocitos B se amplificaron usando PCR, el ADN de los linfocitos B se secuenció y luego las secuencias se procesaron con IgBLAST (NCBI) para identificar las parejas de genes de la línea germinal VH/VL de cada linfocito B.
- 15 Se describen métodos generales de aislamiento y clasificación de las PBMCs humanas a partir de células sanguíneas venosas y mononucleares de la médula ósea en Tiller et al., J Immunol Methods, 2008 Ene 1; 329(1-2):112-24, que se incorpora como referencia en su totalidad. Las PBMCs se aislaron y luego se clasificaron de forma independiente según el marcador de la superficie celular del fenotipo de interés. Los transcritos de genes de Ig de los linfocitos B maduros, sin activar (mn) y clasificados independientemente y las células secretoras de anticuerpos (asc), se amplificaron después por PCR para la determinación de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL. También
- 20 se describen métodos generales de amplificación del ADNc mediante PCR de linfocitos B y los cebadores útiles para ello, en Tiller et al. 2008 (cita anterior). Los cebadores específicos usados, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 (SEQ ID NOS 24-60, respectivamente, por orden de aparición):

para la PCR de la cadena pesada $\mu$ o $\gamma$		
<u>1ª PCR de HC</u>		
5' L-VH 1	ACAGGTGCCCCACTCCCAGGTGCAG	24
5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	23
5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAG	27
5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	24
3' C $\mu$ CH1 (mu)	GGGAATTCTCACAGGAGACGA	21
3'Cg CH1 (gamma)	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC	23
<u>2ª PCR de HC</u>		
5' Agel VH1	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG	38
5' Agel VH1/5	CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG	38
5' Agel VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG	38
5' Agel VH3-23	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG	38
5' Agel VH4	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG	38
5' Agel VH 4-34	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG	40
3' Sall JH 1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG	32
3' Sall JH 3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG	34
3' Sall JH 6	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG	33
3' IgG (interno)	GTTCTGGGGAAGTAGTCCTTGAC	22
para la PCR de la cadena ligera kappa:		

<u>1ª PCR de kLC</u>		
<b>5' L-Vk 1/2</b>	<b>ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG</b>	25
<b>5' L-Vk 3</b>	<b>CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAG</b>	28
<b>5' L-Vk 4</b>	<b>ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG</b>	25
<b>3' Ck 543</b>	<b>GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA</b>	24
<u>2ª PCR de kLC</u>		
<b>5' Pan Vk</b>	<b>ATGACCCAGW CTCCABYCW CCCTG</b>	24
<b>3' Ck 494</b>	<b>GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT</b>	22
para la PCR de la cadena ligera lambda:		
<u>1ª PCR de LC</u>		
<b>5' L-VI 1</b>	<b>GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG</b>	23
<b>5' L-VI 2</b>	<b>GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG</b>	23
<b>5' L-VI 3</b>	<b>GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG</b>	23
<b>5' L-VI 4/5</b>	<b>GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG</b>	23
<b>5' L-VI 6</b>	<b>GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG</b>	23
<b>5' L-VI 7</b>	<b>GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG</b>	23
<b>5' L-VI 8</b>	<b>GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG</b>	23
<b>3'C(</b>	<b>CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG</b>	24
<u>2ª PCR de LC</u>		
<b>5'Agel VI 1</b>	<b>CTGCTACCGGTTCTGGGCCCAGTCTGTGCTGACKCAG</b>	38
<b>5'Agel VI 2</b>	<b>CTGCTACCGGTTCTGGGCCCAGTCTGCCCTGACTCAG</b>	38
<b>5'Agel VI 3</b>	<b>CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG</b>	38
<b>5'Agel VI 4/5</b>	<b>CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA</b>	37
<b>5'Agel VI 6</b>	<b>CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG</b>	38
<b>5'Agel VI 7/8</b>	<b>CTGCTACCGGTTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG</b>	38
<b>3' XhoI CI</b>	<b>CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG</b>	28

Se sintetizaron los ADNc de los linfocitos B maduros, sin activar (mn) y clasificados independientemente y las células secretoras de anticuerpos (asc). Se realizó una PCR anidada, en donde los transcritos del gen V de IgH, Igk e IgL humanos se amplificaron con PCR independientemente. Los resultados de la secuenciación se procesaron con IgBLAST (NCBI) para identificar los respectivos genes de la línea germinal de VH, VK y VL.

#### Ejemplo 2.3 Parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificadas en el repertorio inmune humano

Los datos de parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificados a partir de las publicaciones disponibles tal como se describe en el Ejemplo 2.1, se agruparon con los datos identificados a partir de una muestra humana como se describe en el Ejemplo 2.2. Los datos agrupados se analizaron y se mostraron como una clasificación en la Tabla 6, es decir, la clasificación del porcentaje/proporción (%) de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificadas en el repertorio inmune humano.

Ejemplo 3: Determinación del uso de genes de la línea germinal de VH y VL

Una revisión de la Tabla 6 muestra que un pequeño número de parejas VH/VL son dominantes en el repertorio inmune humano en comparación con el número total de genes de la línea germinal. Wildt et al. 895-896 describieron ese fenómeno. Wildt et al. también describieron que los segmentos génicos de la cadena pesada y ligera expresados frecuentemente están emparejados frecuentemente, y observaron que la mitad de los emparejamientos de la muestra correspondía a solo cinco parejas de genes de la línea germinal de VH/VL.

Además, se evaluaron los datos agrupados y referencias adicionales para identificar los genes de la línea germinal de VH, V<sub>k</sub> y V<sub>λ</sub> que se expresaban de forma independiente (no como parejas) en el repertorio inmune humano. Las referencias de publicaciones adicionales, que incluyen una expresión génica de VH y/o VL no emparejados de la línea germinal, eran Brezinschek H.P. et al. (1997) J. Clin. Invest. 99, 2488, Demaison C. et al. (1995) Immunogenetics 42, 342 y Foster S.J. et al. (1997) J. Clin. Invest. 99, 1614, ambas incorporadas como referencia en su totalidad. Los datos de los Ejemplos 2.1 y 2.2 y referencias adicionales se agruparon y clasificaron para determinar los genes de la línea germinal de VH, V<sub>k</sub> y V<sub>λ</sub> expresados de forma más prominente en el repertorio inmune humano. La clasificación se muestra en la Tabla 5.

Al comparar la Tabla 5, que muestra la prevalencia de los genes de la línea germinal de VH, V<sub>λ</sub> y V<sub>k</sub> no ligados, en el repertorio inmune humano y la Tabla 6, que muestra la prevalencia de los genes de la línea germinal de parejas VH/VL asociadas dentro del repertorio inmune humano, era evidente que muchos de los genes de la línea germinal de VH, V<sub>λ</sub> y V<sub>k</sub> que estaban muy representados cuando se evaluaban de forma independiente de la asociación o el emparejamiento, también estaban muy representados en los emparejamientos de VH/VL.

Esta observación se confirma mediante las representaciones gráficas que se muestran en las Figs. 4-5, que muestran las parejas de genes de la línea germinal de VH/VL del repertorio inmune humano. Las figuras muestran el número real de cada pareja de genes de la línea germinal de VH/VL identificada a partir de los datos agrupados, representada gráficamente en una matriz, en donde el eje Y incluye la clasificación de los genes de la línea germinal de VH, y el eje X incluye la clasificación de los genes de la línea germinal de VL.

Ejemplo 4: Selección de los emparejamientos de genes de la línea germinal de VH/VL para una evaluación adicional de sus propiedades biofísicas

Como etapa siguiente, había que determinar qué parejas de proteínas de la línea germinal se iban a someter a ensayo, ya que hay ~2500 parejas en el repertorio inmune humano y el objetivo de los inventores era identificar qué parejas de proteínas de la línea germinal comprenden propiedades biofísicas favorables que podrían ayudar en la selección y el desarrollo. Una forma sería someter a ensayo las parejas de proteínas de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de la línea germinal que se producen de forma más prominente en el repertorio inmunitario humano, por ejemplo, véase la Tabla 6. Se podría, por ejemplo, seleccionar las mejores cuatrocientas parejas para las pruebas, o seleccionar las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes por encima de cierto umbral. Esta metodología requeriría la síntesis y el ensayo de un gran número de secuencias de parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable; por lo tanto, esta metodología puede que no sea muy eficaz.

Como metodología alternativa, los inventores seleccionaron un subconjunto de las parejas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que era representativo, reproducía con precisión o incluía la mayoría de las parejas prominentes procedentes del repertorio inmune humano. Esta metodología se basaba, en parte, en la observación de que un pequeño número de genes (no emparejados) de la línea germinal de la cadena pesada, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable, son dominantes en el repertorio inmune humano. Por lo tanto, un pequeño número de los genes (no emparejados) de la línea germinal de la cadena pesada y ligera prominentes, se puede combinar para generar un grupo de parejas de VH/VL que son representativas del repertorio inmune humano.

Esta metodología se llevó a cabo de la siguiente manera. En el Ejemplo 3, se determinó la expresión de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable. Como siguiente etapa, se completó un análisis *in silico* de los genes prominentes de la línea germinal de VH, V<sub>λ</sub> y V<sub>k</sub>, en donde se evaluaron al menos los siguientes factores: la longitud de las CDRs, el punto isoeléctrico (pI), (el punto isoeléctrico preferido es 7,5 o superior ya que debería proporcionar estabilidad en un tampón de formulación con pH 5,5 a pH 7 estándar), sitios potenciales de modificaciones postraduccionales (PTMs) (específicamente, sitios de glicosilación ligados a N (N<sub>x</sub>S o N<sub>x</sub>T) o modificaciones químicas tales como la escisión de Asp (frecuentemente en un DP o DQ), la isomerización de Asp (DD, DG), la desamidación (NS, NG) que puede tener lugar *in vivo* (en suero) o después de un almacenamiento en tampón de formulación y conduce a la pérdida de unión del anticuerpo), la presencia de metioninas en las CDRs (pueden oxidarse cuando se exponen a un disolvente), la presencia de cisteínas no apareadas (formarán enlaces disulfuro con cualquier otra cisteína no apareada, lo que conducirá a una reticulación de las proteínas y/o a niveles de expresión más bajos), desviaciones de la línea germinal, la presencia de posibles epítopos de linfocitos T, y la tendencia a una agregación teórica. Los datos seleccionados a partir del análisis *in silico* se muestran en las Figs. 2-3.



Basándose en el análisis *in silico* de los genes más prominentes de la línea germinal VH, Vλ y Vκ, se seleccionó un subconjunto de éstos para la síntesis, la combinación y la prueba funcional subsiguiente. Este subconjunto se muestra en las Figs. 2-3. Al comparar la Tabla 5 y las Figs. 2-3, es evidente que no todos los genes más prominentes de la línea germinal de VH, Vλ y Vκ se seleccionaron para la prueba adicional. De los genes más prominentes de la línea germinal de VH, mostrados en la Tabla 5, IGHV4-34, IGHV4-59 e IGHV3-9 no fueron seleccionados. En su lugar, véase en las Figs. 2-3, se seleccionaron IGHV3-74, IGHV3-73 e IGHV6-1. En total, se seleccionaron 20 genes de VH de la línea germinal. De los genes más prominentes de Vκ de línea germinal, que se muestran en la Tabla 5, no se seleccionaron IGKV4-1, IGKV2-28/2D-28, IGKV1-33/1D-33 e IGKV1-8. En total, se seleccionaron 12 genes de línea germinal de Vκ. De los genes más prominentes de la línea germinal de Vλ mostrados en la Tabla 5, IGLV1-44 no fue seleccionado. En total, se seleccionaron 8 genes de la línea germinal de Vλ.

La Tabla 5 muestra la clasificación del uso de genes de la línea germinal de VH, Vκ y Vλ del repertorio inmune humano y los genes de la línea germinal en **negrita y subrayados** que se seleccionaron para una prueba funcional adicional.

Tabla 5

<u>VH</u>			<u>Vκ</u>			<u>Vλ</u>		
	n=2463			n=1656			n=780	
<b>1</b>	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>10,6</u></b>	<b>1</b>	<b><u>IGKV3-20</u></b>	<b><u>16,2</u></b>	<b>1</b>	<b><u>IGLV2-14</u></b>	<b><u>18,1</u></b>
<b>2</b>	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>8,0</u></b>	<b>2</b>	<b><u>IGKV1-39/1D-39</u></b>	<b><u>14,2</u></b>	<b>2</b>	<b><u>IGLV1-40</u></b>	<b><u>11,3</u></b>
<b>3</b>	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>7,6</u></b>	<b>3</b>	<b><u>IGKV1-5</u></b>	<b><u>11,2</u></b>	3	IGLV1-44	11,3
4	IGHV4-34	6,8	<b>4</b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	<b><u>11,1</u></b>		<b><u>IGLV1-51</u></b>	<b><u>10,0</u></b>
5	IGHV4-59	5,8	5	IGKV4-1	8,5	<b>4</b>	<b><u>IGLV2-23</u></b>	<b><u>8,1</u></b>
<b>6</b>	<b><u>IGHV1-69</u></b>	<b><u>5,3</u></b>	<b>6</b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	<b><u>7,6</u></b>	<b>5</b>	<b><u>IGLV3-21</u></b>	<b><u>8,1</u></b>
<b>7</b>	<b><u>IGHV5-51</u></b>	<b><u>4,6</u></b>	7	IGKV2-28/2D-28	6,0	<b>6</b>	<b><u>IGLV1-47</u></b>	<b><u>6,5</u></b>
<b>8</b>	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>4,5</u></b>	8	IGKV1-33/1D-33	4,6	<b>7</b>	<b><u>IGLV3-1</u></b>	<b><u>5,3</u></b>
<b>9</b>	<b><u>IGHV1-18</u></b>	<b><u>4,1</u></b>	<b>9</b>	<b><u>IGKV2-30</u></b>	<b><u>2,6</u></b>	<b>8</b>	<b><u>IGLV2-11</u></b>	<b><u>5,1</u></b>
<b>10</b>	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>4,0</u></b>	<b>10</b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	<b><u>2,4</u></b>	<b>9</b>	IGLV2-8	4,5
<b>11</b>	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>3,3</u></b>	<b>11</b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	<b><u>2,4</u></b>	10	IGLV6-57	1,7
<b>12</b>	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>3,3</u></b>	<b>12</b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	<b><u>2,2</u></b>	11	IGLV3-25	1,5
<b>13</b>	<b><u>IGHV1-2</u></b>	<b><u>3,2</u></b>	13	IGKV1-8	1,9	12	IGLV7-46	1,5
<b>14</b>	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>3,0</u></b>	<b>14</b>	<b><u>IGKV1-16</u></b>	<b><u>1,3</u></b>	13	IGLV1-36	1,2
<b>15</b>	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>3,0</u></b>	<b>15</b>	<b><u>IGKV1-6</u></b>	<b><u>1,1</u></b>	14	IGLV7-43	1,2
<b>16</b>	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>2,7</u></b>	<b>16</b>	<b><u>IGKV1-12</u></b>	<b><u>1,1</u></b>	15	IGLV9-49	1,2
<b>17</b>	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>2,6</u></b>	17	IGKV2D-29	1,0	16	IGLV4-69	1,0
18	IGHV3-9	2,2	18	IGKV1-13	0,7	17	IGLV2-18	0,6
<b>19</b>	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>2,1</u></b>	19	IGKV1D-8	0,5	18	IGLV3-10	0,5
<b>20</b>	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>2,1</u></b>	20	IGKV2-24	0,5	19	IGLV3-27	0,5
<b>21</b>	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>1,6</u></b>	21	IGKV5-2	0,4	20	IGLV3-9	0,3
22	IGHV1-24	1,1	22	IGKV1D-12	0,3	21	IGLV3-12	0,1
23	IGHV4-61	1,1	23	IGKV2-40/2D-40	0,3	22	IGLV3-19	0,1
24	IGHV1-8	1,1	24	IGKV3D-20	0,3	23	IGLV3-22	0,1
25	IGHV1-3	1,0	25	IGKV1D-43	0,2	24	IGLV4-60	0,1
26	IGHV3-49	1,0	26	IGKV2D-30	0,2	25	IGLV8-61	0,1
27	IGHV3-43	0,6	27	IGKV3D-11	0,2	26	IGLV3-16	0,0
28	IGHV4-28	0,6	28	IGKV3D-15	0,2	27	IGLV4-3	0,0
29	IGHV3-64	0,5	29	IGKV2-29	0,2	28	IGLV5-37	0,0

<u>VH</u>			<u>Vκ</u>			<u>Vλ</u>		
	n=2463			n=1656			n=780	
30	IGHV7-81	0,5	30	IGKV1D-16	0,1	29	IGLV5-39	0,0
31	IGHV3-13	0,4	31	IGKV1D-17	0,1	30	IGLV5-45	0,0
32	IGHV3-72	0,4	32	IGKV3D-7	0,1	31	IGLV5-52	0,0
33	IGHV1-58	0,3	33	IGKV6-21/6D-21	0,1	32	IGLV10-54	0,0
<b>34</b>	<b><u>IGHV3-73</u></b>	<b><u>0,3</u></b>	34	IGKV6D-41	0,1			
35	IGHV3-66	0,2	35	IGKV1D-13	0,0			
36	IGHV7-4.1	0,2						
37	IGHV2-5	0,1						
38	IGHV4-30.2	0,1						
39	IGHV3-20	0,1						
<b>40</b>	<b><u>IGHV6-1</u></b>	<b><u>0,0</u></b>						
41	IGHV1-e	0,0						
42	IGHV1-f	0,0						
43	IGHV1-45	0,0						
44	IGHV2-26	0,0						
45	IGHV2-70	0,0						
66	IGHV3-d	0,0						
47	IGHV4-b	0,0						
48	IGHV4-30.4	0,0						
49	IGHV5-a	0,0						

Ejemplo 4.1: Recombinación de los genes más abundantes de la línea germinal de VH, Vκ y Vλ para obtener la representación de las parejas de VH/VL más prominentes en el repertorio inmune humano

- 5 Como etapa siguiente, los 20 genes de VH, 12 genes de Vκ y 8 genes de Vλ de la línea germinal seleccionados a partir de los genes de la línea germinal VH, Vκ y Vλ, se sintetizaron y se combinaron para generar 400 parejas de genes de VH/VL de la línea germinal, en donde estas parejas se sometieron a ensayo posteriormente para analizar sus propiedades biofísicas. La Tabla 6 muestra que las 400 parejas de genes de la línea germinal de VH/VL generadas para las pruebas funcionales, de hecho, reproducen con precisión o incluyen la mayoría de las parejas prominentes de genes de la línea germinal de VH/VL en el repertorio inmune humano. La Tabla 6 muestra la clasificación de las parejas de VH/VL expresadas en el repertorio inmune humano, en donde las 400 parejas de VH/VL que se sometieron a ensayo están en negrita y subrayadas.
- 10

Tabla 6: Las 400 parejas de genes de la línea germinal de VH/VL sometidas a ensayo funcional son representativas de las parejas de genes de la línea germinal de VH/VL identificadas en el repertorio inmune humano

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
<b><u>1</u></b>	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGKV1-5</u></b>	<b><u>1,26</u></b>
2	IGHV4-34	IGKV3-20	1,17
<b><u>3</u></b>	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGKV3-20</u></b>	<b><u>1,12</u></b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	<b><u>1,03</u></b>
<b><u>5</u></b>	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	<b><u>0,94</u></b>

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
6	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89
<u>7</u>	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,84</u>
	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,84
8	IGHV4-59	IGKV3-20	0,70
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,70</u>
<u>9</u>	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,66</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,66</u>
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,66</u>
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,66</u>
10	IGHV3-23	IGKV4-1	0,61
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,61</u>
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,61</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 3-21</u>	<u>0,61</u>
<u>11</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,56</u>
12	IGHV3-30	IGKV4-1	0,51
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,51</u>
13	IGHV4-59	IGKV4-1	0,47
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,47</u>
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,47</u>
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,47</u>
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,47</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,47</u>
	IGHV4-39	IGLV 2-8	0,47
	IGHV4-34	IGLV 2-14	0,47
<u>14</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,42</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,42</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,42</u>
	IGHV4-34	IGKV1-5	0,42
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,42</u>
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,42</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 1-51</u>	<u>0,42</u>
	IGHV4-34	IGLV 1-51	0,42
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 1-51</u>	<u>0,42</u>

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
15	IGHV3-53	IGLV 1-44	0,42
	IGHV4-59	IGKV3-15	0,37
	IGHV4-34	IGKV3-15	0,37
	IGHV5-51	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-69	IGKV4-1	0,37
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,37</u>
	IGHV4-59	IGLV 1-40	0,37
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,37</u>
	IGHV1-69	IGLV 1-44	0,37
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,37</u>
16	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,37</u>
	IGHV3-23	IGKV2-28/2D-28	0,33
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-9</u>	<u>0,33</u>
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,33
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,33</u>
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,33
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV2-14</u>	<u>0,33</u>
	IGHV4-39	IGLV 1-44	0,33
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,33</u>
17	IGHV3-9	IGLV 2-23	0,33
	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,28
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,28</u>
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,28
	IGHV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,28
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,28</u>
	IGHV5-51	IGKV1-13	0,28
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,28</u>

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,28</u>
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,28
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,28
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,28</u>
	IGHV3-33	IGKV4-1	0,28
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 3-21</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,28</u>
	IGHV4-34	IGLV 1-40	0,28
	IGHV4-34	IGLV 1-47	0,28
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 1-47</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,28</u>
	IGHV3-9	IGLV 2-14	0,28
	IGHV4-4	IGLV 1-44	0,28
<u>18</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-17</u>	<u>0,23</u>
	IGHV4-39	IGKV4-1	0,23
	IGHV4-39	IGKV2-28/2D-28	0,23
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,23</u>
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,23
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,23</u>
	IGHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,23
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,23</u>
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,23
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,23</u>

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-61	IGKV 4-1	0,23
	IGHV3-23	IGLV 1-44	0,23
	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,23
	IGHV5-51	IGLV 1-44	0,23
	<b><u>IGHV1-69</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	<b><u>IGHV1-69</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	<b><u>IGHV1-18</u></b>	<b><u>IGLV 2-14</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	<b><u>IGHV1-18</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGLV 2-14</u></b>	<b><u>0,23</u></b>
	IGHV1-2	IGLV 1-44	0,23
19	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV3-23	IGKV1-8	0,19
	IGHV3-30	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV4-39	IGKV1-33/1D-33	0,19
	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV4-59	IGKV3-11	0,19
	<b><u>IGHV5-51</u></b>	<b><u>IGKV1-5</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV5-51	IGKV2-28/2D-28	0,19
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGKV2-30</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV1-18</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV1-18</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV3-21	IGKV4-1	0,19
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV3-15	IGKV4-1	0,19
	IGHV3-15	IGKV1-33/1D-33	0,19
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGKV1-39/1D-39</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGKV1-5</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV4-31	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-33	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,19
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	<b><u>0,19</u></b>

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGKV3-20</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGKV1-5</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,19
	IGHV1-24	IGKV3-11	0,19
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,19
	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV3-30	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV 2-14	0,19
	IGHV4-59	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV 1-51	0,19
	IGHV4-34	IGLV 2-8	0,19
	<b><u>IGHV5-51</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV1-69	IGLV 2-8	0,19
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV3-15	IGLV 1-44	0,19
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGLV 2-14</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV3-9	IGLV 1-44	0,19
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGLV 2-14</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	<b><u>0,19</u></b>
	IGHV4-61	IGLV 1-44	0,19
	IGHV1-8	IGLV 2-14	0,19
	IGHV4-28	IGLV 2-23	0,19
20	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGKV1-16</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGKV1-6</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	IGHV4-59	IGKV1-5	0,14
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,14
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,14

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,14
	IGHV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-48	IGKV1-8	0,14
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,14
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	IGHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,14
	<b><u>IGHV1-2</u></b>	<b><u>IGKV1-5</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,14
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGKV3-20</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,14
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,14
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,14
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGKV1-39/1D-39</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGKV1-5</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,14
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	<b><u>0,14</u></b>
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,14
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	0,14
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGKV1-5</u></b>	0,14
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	0,14
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,14
	IGHV1-3	IGKV3-15	0,14
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,14
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,14
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,14
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,14
	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	0,14
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,14
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,14
	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,14
	IGHV4-39	IGLV 2-18	0,14



"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-59	IGLV 1-47	0,14
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,14
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,14
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,14
	IGHV3-7	IGLV 1-44	0,14
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,14
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,14
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,14
	IGHV1-18	IGLV 1-44	0,14
	IGHV1-18	IGLV 1-51	0,14
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,14
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,14
	IGHV3-15	IGLV 7-46	0,14
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,14
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,14
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,14
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,14
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,14
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,14
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,14
	IGHV3-11	IGLV 1-44	0,14
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,14
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,14
	IGHV3-9	IGLV 1-47	0,14
	IGHV3-9	IGLV 2-11	0,14
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,14
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,14
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,14
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,14
	IGHV1-46	IGLV 1-44	0,14
	IGHV4-61	IGLV 2-14	0,14
21	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,09
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-8	0,09
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,09

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,09
	IGHV3-30	IGKV1 D-8	0,09
	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGKV2-30</u></b>	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,09
	<b><u>IGHV5-51</u></b>	<b><u>IGKV2-30</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV1-69</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,09
	IGHV1-69	IGKV1-8	0,09
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,09
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-13	0,09
	IGHV1-18	IGKV4-1	0,09
	<b><u>IGHV1-18</u></b>	<b><u>IGKV2-30</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>IGKV1-16</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	0,09
	IGHV3-21	IGKV2-28/2D-28	0,09
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,09
	IGHV3-21	IGKV1-8	0,09
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGKV1-6</u></b>	0,09
	IGHV4-31	IGKV4-1	0,09
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV1-2</u></b>	<b><u>IGKV3-15</u></b>	0,09
	IGHV1-2	IGKV2-28/2D-28	0,09
	<b><u>IGHV1-2</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	0,09
	IGHV3-33	IGKV1-33/1D-33	0,09
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGKV3-20</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,09
	IGHV3-53	IGKV1-8	0,09

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-11	IGKV4-1	0,09
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGKV1-6</u></b>	0,09
	IGHV3-9	IGKV3-15	0,09
	IGHV3-9	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-9	IGKV1-16	0,09
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGKV2-30</u></b>	0,09
	IGHV4-4	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV4-4	IGKV2D-29	0,09
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGKV3-11</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGKV1-16</u></b>	0,09
	IGHV4-61	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-8	IGKV3-20	0,09
	IGHV1-8	IGKV4-1	0,09
	IGHV1-24	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV1-24	IGKV2-30	0,09
	IGHV1-3	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-49	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-49	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-43	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-64	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-64	IGKV3-11	0,09
	IGHV7-81	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-13	IGKV4-1	0,09
	IGHV3-72	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-72	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-58	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-66	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-23	IGLV 1-36	0,09
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,09
	IGHV3-30	IGLV 9-49	0,09
	IGHV3-30	IGLV 3-10	0,09
	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,09
	IGHV4-39	IGLV 6-57	0,09
	IGHV4-59	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-59	IGLV 3-21	0,09

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-59	IGLV 2-11	0,09
	IGHV4-34	IGLV 1-44	0,09
	IGHV4-34	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-34	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-34	IGLV 3-25	0,09
	IGHV5-51	IGLV 1-36	0,09
	IGHV5-51	IGLV 3-25	0,09
	<b><u>IGHV1-69</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV1-69</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV1-69</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGLV 2-14</u></b>	0,09
	IGHV1-18	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-18	IGLV 6-57	0,09
	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	0,09
	IGHV3-21	IGLV 1-44	0,09
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,09
	IGHV3-21	IGLV 4-69	0,09
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,09
	IGHV3-15	IGLV 2-8	0,09
	IGHV3-15	IGLV 7-43	0,09
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,09
	IGHV1-2	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-2	IGLV 7-46	0,09
	IGHV3-33	IGLV 6-57	0,09
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGLV 2-14</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,09
	IGHV3-11	IGLV 4-69	0,09
	IGHV3-9	IGLV 3-21	0,09
	IGHV3-9	IGLV 2-8	0,09
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGLV 2-14</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	0,09
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,09
	IGHV4-4	IGLV 2-8	0,09

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,09
	IGHV4-61	IGLV 2-11	0,09
	IGHV1-8	IGLV 1-47	0,09
	IGHV1-24	IGLV 2-23	0,09
	IGHV1-3	IGLV 2-14	0,09
	IGHV1-3	IGLV 2-23	0,09
	IGHV1-3	IGLV 3-1	0,09
	IGHV3-49	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-44	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-51	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-36	0,09
	IGHV3-43	IGLV 1-51	0,09
	IGHV3-64	IGLV 3-21	0,09
	IGHV7-81	IGLV 2-14	0,09
	IGHV7-81	IGLV 3-21	0,09
22	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGKV2-30</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGKV1-12</u></b>	0,05
	IGHV3-23	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-23	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-23	IGKV1D-13	0,05
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGKV1-16</u></b>	0,05
	IGHV3-30	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-30	IGKV5-2	0,05
	IGHV3-30	IGKV2D-30	0,05
	<b><u>IGHV4-39</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,05
	IGHV4-39	IGKV3D-15	0,05
	IGHV4-59	IGKV2-30	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-59	IGKV1D-43	0,05
	IGHV4-59	IGKV2D-30	0,05
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,05

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-34	IGKV1-12	0,05
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,05
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,05
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,05
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-12</u>	0,05
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,05
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,05
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,05
	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,05
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,05
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,05
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,05
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-12</u>	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,05
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,05
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,05
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,05
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,05
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,05
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-15	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-15	IGKV1D-43	0,05
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-29	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-33/1D-33	0,05
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,05

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	<b><u>IGHV1-2</u></b>	<b><u>IGKV1-6</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,05
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGKV1-16</u></b>	0,05
	IGHV3-33	IGKV2-24	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-28/2D-28	0,05
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGKV1-12</u></b>	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-29	0,05
	IGHV3-53	IGKV1D-16	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-33/1D-33	0,05
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGKV1-12</u></b>	0,05
	IGHV3-11	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-9	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-9	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-8	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-9	IGKV1D-8	0,05
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGKV1-17</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGKV1-27</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGKV1-6</u></b>	0,05
	IGHV4-4	IGKV1D-8	0,05
	IGHV1-46	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-46	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-46	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-61	IGKV3-11	0,05
	IGHV4-61	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,05

## ES 2 696 548 T3

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-9	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,05
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,05
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-24	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-6	0,05
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,05
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV4-28	IGKV3-20	0,05
	IGHV4-28	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV3-43	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,05
	IGHV3-43	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-43	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-64	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-64	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-64	IGKV2D-29	0,05
	IGHV7-81	IGKV1-5	0,05
	IGHV7-81	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-81	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-13	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-72	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-73	IGKV2-28/2D-28	0,05



"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	<b><u>IGHV3-73</u></b>	<b><u>IGKV1-9</u></b>	0,05
	IGHV1-58	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-58	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-58	IGKV3-11	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-20	IGKV1-39/1D-39	0,05
	<b><u>IGHV3-23</u></b>	<b><u>IGLV1-47</u></b>	0,05
	IGHV3-23	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-23	IGLV 7-43	0,05
	IGHV3-23	IGLV 2-18	0,05
	IGHV3-23	IGLV 3-19	0,05
	<b><u>IGHV3-30</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,05
	IGHV3-30	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-30	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-30	IGLV 3-27	0,05
	IGHV4-39	IGLV 7-46	0,05
	IGHV4-39	IGLV 3-9	0,05
	IGHV4-59	IGLV 2-8	0,05
	IGHV4-59	IGLV 6-57	0,05
	IGHV4-59	IGLV 3-12	0,05
	IGHV4-34	IGLV 2-11	0,05
	IGHV4-34	IGLV 1-36	0,05
	IGHV4-34	IGLV 7-43	0,05
	IGHV4-34	IGLV 9-49	0,05
	IGHV5-51	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-69	IGLV 6-57	0,05
	IGHV1-69	IGLV 3-25	0,05
	IGHV1-69	IGLV 3-10	0,05
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-7</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,05
	IGHV3-7	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-7	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-7	IGLV 3-27	0,05
	IGHV1-18	IGLV 2-23	0,05
	<b><u>IGHV1-18</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,05

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-18	IGLV 1-36	0,05
	IGHV1-18	IGLV 3-25	0,05
	IGHV1-18	IGLV 3-10	0,05
	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	0,05
	IGHV3-48	IGLV 1-44	0,05
	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-48</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,05
	IGHV3-48	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-48	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-48	IGLV 9-49	0,05
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-21</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,05
	IGHV3-21	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-21	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-21	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-21	IGLV 7-46	0,05
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGLV 2-14</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-15</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,05
	IGHV3-15	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-15	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-15	IGLV 2-18	0,05
	IGHV3-15	IGLV 3-22	0,05
	IGHV4-31	IGLV 1-44	0,05
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV4-31</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,05
	IGHV4-31	IGLV 4-69	0,05
	IGHV4-31	IGLV 7-43	0,05
	<b><u>IGHV1-2</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV1-2</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,05
	IGHV1-2	IGLV 3-27	0,05
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	0,05
	IGHV3-33	IGLV 1-44	0,05
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-33</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,05

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-33	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-33	IGLV 3-27	0,05
	IGHV3-33	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-33	IGLV 3-9	0,05
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-53</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,05
	IGHV3-53	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-53	IGLV 7-46	0,05
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-11</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,05
	IGHV3-11	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-11	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-11	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-11	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-11	IGLV 8-61	0,05
	IGHV3-9	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-9	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-9	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-9	IGLV 4-60	0,05
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-74</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,05
	IGHV3-74	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-74	IGLV 7-43	0,05
	IGHV3-74	IGLV 7-46	0,05
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV4-4</u></b>	<b><u>IGLV 3-1</u></b>	0,05
	IGHV4-4	IGLV 3-25	0,05
	IGHV4-4	IGLV 9-49	0,05
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGLV 2-23</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV1-46</u></b>	<b><u>IGLV 3-21</u></b>	0,05
	IGHV1-46	IGLV 6-57	0,05

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-61	IGLV 2-23	0,05
	IGHV4-61	IGLV 3-21	0,05
	IGHV4-61	IGLV 3-1	0,05
	IGHV4-61	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-8	IGLV 1-51	0,05
	IGHV1-8	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-8	IGLV 2-8	0,05
	IGHV1-8	IGLV 9-49	0,05
	IGHV1-24	IGLV 2-14	0,05
	IGHV1-24	IGLV 1-40	0,05
	IGHV1-24	IGLV 1-44	0,05
	IGHV1-24	IGLV 3-21	0,05
	IGHV1-24	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-3	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-49	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-8	0,05
	IGHV4-28	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV 2-11	0,05
	IGHV3-43	IGLV 3-1	0,05
	IGHV3-43	IGLV 1-36	0,05
	IGHV3-43	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-64	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-64	IGLV 7-43	0,05
	IGHV7-81	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-72	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-72	IGLV 4-69	0,05
	<b><u>IGHV3-73</u></b>	<b><u>IGLV 1-40</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-73</u></b>	<b><u>IGLV 1-51</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-73</u></b>	<b><u>IGLV 1-47</u></b>	0,05
	<b><u>IGHV3-73</u></b>	<b><u>IGLV 2-11</u></b>	0,05
	IGHV3-73	IGLV 6-57	0,05
	IGHV1-58	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-66	IGLV 1-44	0,05

"pos": representa la posición de la clasificación relativa de las parejas de VH/VL tal y como se determina por el porcentaje (%) de cada pareja de VH/VL a partir de los datos agrupados totales. N = 2137 linfocitos B

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-66	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-66	IGLV 3-25	0,05
	IGHV4-30.2	IGLV 3-21	0,05
	IGHV7-4.1	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-20	IGLV 2-14	0,05

#### Ejemplo 5: Generación de genes de la línea germinal para el análisis funcional

Como etapa siguiente, los genes de la línea germinal VH, VL y Vκ seleccionados para la combinación y la posterior prueba, como se muestran en la Tabla 5, fueron enviados a Geneart (Regensburg, Alemania) para la optimización de codones respecto a la expresión en *E. coli* (neutro para la expresión en mamífero sin codones humanos raros), la optimización de genes para eliminar motivos de corte y empalme e inhibidores potenciales y la síntesis.

Las secuencias de proteínas de la línea germinal de cada uno de los genes de la línea germinal VH, VL y Vκ se muestran en las Figs. 6-8. Cada secuencia de genes de la línea germinal se sintetizó del modo siguiente:

a) para VH: secuencia líder (secuencia señal phoA modificada que incorpora un sitio de restricción NheI como se muestra en la Tabla 1); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio de restricción BssHII (GCGCGC) como se muestra en la Fig. 1); CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) (SEQ ID NO: 1) del anticuerpo 4D5 como se emplea en Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y JH4 FR4 (que incorpora un sitio de restricción XhoI (CTCGAG) como se muestra en la Fig. 1);

b) para Vκ: secuencia líder (secuencia señal ompA modificada que incorpora el sitio de restricción NdeI como se muestra en la Tabla 2); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio de restricción BbsI (GAAGAC) como se muestra en la Fig. 1), CDR-L3 similar a kappa (QQHYTTPPT) (SEQ ID NO: 2) de acuerdo con Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y Jk1 FR4 (que incorpora un sitio de restricción KpnI (GGTACC) como se muestra en la Fig. 1);

c) para VL: secuencia líder (secuencia señal ompA modificada que incorpora el sitio de restricción NdeI como se muestra en la Tabla 2); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio de restricción BbsI (GAAGAC) como se muestra en la Fig. 1), CDR-L3 similar a lambda (QSYDSSLGTVV) (SEQ ID NO: 3) de acuerdo con Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y la JI2/3 FR4 (que incorpora un sitio de restricción KpnI/Acc65I (GGTACC) como se muestra en la Fig. 1).

#### Ejemplo 6: Prueba funcional de parejas de proteínas de la línea germinal representativas del repertorio inmune humano

Las 400 parejas de proteínas de la línea germinal se insertaron entonces en vectores de presentación en fagos, vectores de expresión en *E. coli* y mamífero en formato Fab o IgG1 humana y después se sometieron a ensayo las propiedades siguientes: a) presentación relativa después de la producción en fagos y ELISA para fagos en el formato Fab, b) rendimiento de la expresión relativa de Fab después de la producción en Fab en *E. coli*, lisis celular de *E. coli* y detección con ELISA del Fab producido; c) estabilidad frente a la temperatura de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis celular e *E. coli* y detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de una incubación a temperaturas elevadas; d) estabilidad en suero bovino/ratón de Fab procedente de lisados de *E. coli* mediante detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de una incubación en suero bovino/ratón; e) rendimiento de la expresión relativa de IgG1 humana después de la producción de IgG1 en células de mamífero y detección con ELISA de IgG1 secretada procedente de material sobrenadante de un cultivo de células; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 humana mediante detección con ELISA de IgG no desnaturalizada después de una incubación en suero bovino/ratón.

#### Ejemplo 6.1: Generación de una agrupación de Fab presentada en fagos para una caracterización funcional

El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo sintetizados en el Ejemplo 5, que se muestran en la Tabla 5, se clonaron en el vector de presentación de Fab tricistrónico, pJPd1 (Fig. 9) para la prueba funcional. Las agrupaciones de Fab se generaron de modo que contenían combinaciones de cada uno de los genes maestros, las 20 VH, combinadas con las 8 VL y 12 Vκ, produciendo las 400 combinaciones mostradas en la Tabla 6.

Los fagos que comprendían las parejas de genes anteriores se produjeron a pequeña escala utilizando placas de 96

pocillos. Se generó una placa maestra llenando cada uno de los pocillos con medio 2xYT/CAM/TET/Gluc e inoculando con clones procedentes de las 400 combinaciones de VH/VL, en donde pMORPH30\_Vk3-11\_AQA/VH3-23\_TKA o pMORPH30\_Vk3-11\_AYA/VH3-23\_VLA (pMORPH30 se muestra en la Fig. 12) se utilizaron como control. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C con agitación. Las placas maestras se almacenaron con una concentración final de 15% de glicerol, y se congelaron a -80°C.

Se produjeron placas adicionales de 96 pocillos para la producción de fagos usando 2xYT/CAM/TET/Gluc como medio y se inocularon con clones de las placas maestras descritas anteriormente. Las placas se incubaron a 37°C durante ~2-4 h mientras se agitaban a 400 rpm, hasta que se alcanzó una DO600nm de ~0,5.

Las placas se infectaron con 5 µl de fago auxiliar por pocillo (Hyperphage; PROGEN; 1 x 10<sup>12</sup> pfu/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 45 min sin agitación y después durante 60 min con agitación a 400 rpm. Las bacterias se centrifugaron a 2200 g durante 5 min a 4°C.

El material sobrenadante que contenía el fago auxiliar se retiró y los sedimentos de E. coli infectadas se resuspendieron con 2xYT/Cam/TET/Kan/IPTG sin glucosa. Los sedimentos resuspendidos se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos profundos llenados previamente con 2xYT/Cm/TET/Kan/IPTG. Las placas se incubaron durante una noche a 22°C, con agitación. El material sobrenadante que contenía los fagos se recogió mediante centrifugación y se retiraron las células de E. coli y los desechos celulares.

#### Ejemplo 6.2: Evaluación de la clasificación de la presentación en fagos de Fab usando ELISA

El material sobrenadante de fagos preparado como se ha descrito en el Ejemplo 6.1, se utilizó para clasificar la presentación en fagos de Fab en ensayos de ELISA de fagos. La presentación de los fragmentos Fab se evaluó en un ELISA con fagos utilizando dos anticuerpos de captura diferentes:

(1) El anticuerpo anti-M13 (Amersham #27-9420-01) se utilizó para la captura de partículas de fago a través de la proteína de recubrimiento principal g8p; por lo tanto, se pudo determinar el título de fagos.

(2) Se utilizó un anticuerpo anti-Fd (The Binding Site #PC075), que se une al Fab presentado; por tanto, solo se capturan Fabs que se presentan en fagos que comprenden los genes maestros.

Los anticuerpos de captura respectivos se inmovilizaron sobre placas negras de 96 pocillos Maxisorp<sup>®</sup> dispensando 100 µl de solución de anticuerpo a una concentración de 7,5 µg/ml para el anticuerpo anti-M13 y una concentración de 1,0 µg/ml para el anticuerpo anti-Fd en distintos pocillos, sellando la placa con papel de aluminio laminado e incubando durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron dos veces con TBST, y cada pocillo se bloqueó con 300 µl de CTBST durante 1 h a temperatura ambiente.

Tanto el material sobrenadante de fagos como las muestras de referencia se transfirieron para la detección de la siguiente manera. Las placas de ELISA bloqueadas se lavaron dos veces con TBST. Se transfirieron 100 µl de material sobrenadante de fagos diluido adecuadamente en CTBST desde las placas de dilución a las placas de ELISA recubiertas, se incubaron durante 1 - 2 h a temperatura ambiente, y se lavaron 5x con TBST. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugado de anti-M13 y peroxidasa (Amersham) diluido 1:5000 en CTBST, y se incubaron durante 1 - 2 h a temperatura ambiente. La solución de trabajo Quanta Blu (Pierce) se preparó mezclando 1 parte (por ejemplo, 0,5 ml) de solución de peróxido con 9 partes (por ejemplo, 4,5 ml) de solución de sustrato y equilibrando a temperatura ambiente durante al menos 30 min. Las placas de ELISA se lavaron 5x con TBST, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de trabajo QuantaBlu. La fluorescencia se midió después de un tiempo de incubación de ~2 min (excitación: 320 nm, emisión: 430 nm) y posteriormente a intervalos de 5 min.

La evaluación de los datos del ELISA se completó del modo siguiente: se crearon curvas de calibración mediante el uso de una preparación de fagos de referencia HuCAL GOLD (VH3 kappa + lambda) y se calcularon los títulos del material sobrenadante de los fagos y los controles. Para cada muestra, el título de anti-Fd se dividió por el título de anti-M13 (anti-pVIII), la relación resultante es la tasa de presentación relativa. La Tabla 12 muestra las tasas de presentación relativa para la mayoría de las 400 parejas de proteínas de la línea germinal.

#### Ejemplo 6.3: Escrutinio con ELISA de 400 combinaciones de VH/VL para determinar el rendimiento de la expresión de Fab en lisados de E. coli

Las placas maestras (MP) se inocularon eligiendo clones transformados con agrupaciones de combinaciones de VH/VL en el vector de expresión de Fab, pJPx1 (que se muestra en la Fig. 10) en medio 2YT/Cam/1% de Gluc. por pocillo. Estas placas se incubaron a 37°C durante una noche con agitación. Las placas de expresión (EP) se inocularon con 2,5 µl de los cultivos procedentes de MPs en 2YT/Cam/0,1% de glucosa por pocillo. Los controles (véase la Tabla 8) se inocularon a partir de reservas de glicerol. Estas placas se incubaron durante 6 horas a 37°C y se agitaron, a continuación, la expresión de Fab fue inducida por la adición de IPTG y se incubaron a 22°C durante una noche con agitación. Los lisados celulares de E. coli se produjeron mediante la adición de ácido bórico/EDTA/tampón de lisozima a las EPs (1 h de incubación a 22°C, agitación), y los lisados bacterianos se bloquearon posteriormente con 12,5% de MPBST, agitando al menos durante 30 min a temperatura ambiente. Los lisados de E. coli procedentes de las placas de expresión se diluyeron de forma adecuada en 0,5% de MBPS y se utilizaron

en el siguiente ensayo.

La Tabla 7 muestra los anticuerpos de recubrimiento sin marcar y los anticuerpos de detección marcados con AP que se utilizaron.

Tabla 7:

	Nom- bre MOR	Marca- dor	Hospeda- dor	Anticuer- po	Empre- sa	Núme- ro	Concentra- ción	Dilu- ción	Lote
Ab de recu- brimiento	15	sin mar- car	oveja	anti-IgG humana (Fd)	Binding Site	pc075	12,1 mg/ml	1:1000	236366, Exp 2009/10
Ab de detec- ción	AP27	AP	ratón	anti- FlagM2	Sigma	A9469	1,1 mg/ml	1:5000	048K6143 , lote nuevo

5

La Tabla 8 describe los controles utilizados.

Tabla 8:

Nº	Nombre de la estructura artificial
<b>3</b>	pMx11_FH VH1-69 VLA_VI1-40 AYA
<b>5</b>	pMx11_FH VH3-23 VLA_Vk3-11 AYA
<b>BEL vacío</b>	pMx9_APStuffer_FHClone1 (¡que no contiene moléculas Fab!)

El ELISA de escrutinio comprendió las siguientes etapas: Recubrimiento de 384 pocillos de una placa MaxiSorp con anticuerpos específicos de Fd anti-IgG humana diluidos en PBS, y se incubaron durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron 2 x con PBST y se bloquearon mediante adición de (leche en polvo al 5% en PBS) a cada pocillo e incubando durante 1-2 h a TA, mientras se agitaba. A continuación, las placas se lavaron de nuevo con PBST, y los lisados de E. coli bloqueados previamente, diluidos en 0,5% de MPBS, se añadieron y se incubaron durante 1 h con agitación a TA. Además, se añadieron los controles #3 y #5. A continuación, las placas se lavaron con PBST y el anticuerpo de detección marcado con AP se diluyó en 0,5% de MPBS. Se añadió el anticuerpo de detección diluido y después se incubó durante 1 h a TA mientras se agitaba suavemente. La señal se identificó del modo siguiente: lavando de los pocillos con TBST y añadiendo 20 µl de AttoPhos (diluido 1:5 en ddH<sub>2</sub>O), haciendo una lectura a los 5 min y a los 7-8 min empleando el programa Tecan (infiniTe F200), PrimeScreen.

Los rendimientos de la expresión de Fab relativa se calculan dividiendo la señal de ELISA de la pareja respectiva de VH/VL por la señal de ELISA del Fab de referencia pMx11\_FH VH1-69 VLA\_VI1-40 AYA. Por tanto, las señales de ELISA igualmente altas dan como resultado un rendimiento de la expresión de Fab relativa de 1. El Fab de referencia se expresa en un plásmido pMORPHX11 (se muestra en la Fig. 11) que comprende a) la secuencia señal de la cadena pesada de phoA modificada que comprende el sitio de restricción NheI C-terminal; b) la secuencia señal de la cadena ligera ompA modificada que comprende el sitio de restricción NdeI C-terminal; c) las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable del gen de la línea germinal VH1-69\*01, como se muestra en la Figura 6A, d) las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena ligera variable del gen de la línea germinal IGLV1-40 como se muestra en la Figura 8A; e) que incorpora la CDR-H3 (WGDDGFYAMDY) (SEQ ID NO: 1) del anticuerpo hu4D5-8, y la secuencia proteica de la línea germinal de JH4 para FR4 de cadena pesada; f) que incorpora la región CDR-L3 (QSYDSSLGSGVV) (SEQ ID NO: 3) y la secuencia proteica de la línea germinal de JI2/3 para FR4 de cadena ligera. El hu4D5-8 se describe en Carter P. et al. (1992) "Humanization of an anti-p185Her2 antibody for human cancer therapy" Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289 y Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553. Todos los genes se generaron en Geneart (Regensburg, Alemania). Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Ejemplo 6.4: ELISA de escrutinio de 400 combinaciones de VH/VL para determinar la estabilidad frente a la temperatura de Fab en lisados BEL

Las placas de expresión se generaron como en el Ejemplo 6.3. Lisados de E. coli diluidos procedentes de las placas de expresión se incubaron a diferentes temperaturas durante 45 minutos y se utilizaron en el siguiente ensayo. La Tabla 9 muestra los anticuerpos de recubrimiento sin marcar y los anticuerpos de detección marcados con AP que se utilizaron.

Tabla 9:

	Nom- bre MOR	Marca- dor	Hospeda- dor	Anticuer- po	Empre- sa	Núme- ro	Concentra- ción	Dilu- ción	Lote
<b>Ab de recu- brimiento</b>	57	sin mar- car	Ratón	Anticuerpo monoclo- nal anti IgG1 y poli- histidina (anti 6x- histidina); polipépti- dos que contienen un marca- dor de polihistidi- na	R&D Sys- tems	MAB05 0	500 µg/ml	1:250	AEJ170811 1
<b>Ab de de- tección</b>	AP30	AP	cabra	cadena ligera kappa anti- humano	Sigma	A3813	2,3 mg/ml	1:2300	018K6069
<b>Ab de de- tección</b>	AP5	AP	cabra	cadena ligera lambda anti- humano	Sigma	A2904	0,8 mg/ml	1:800	096K6030

5 El ELISA de escrutinio comprendía las siguientes etapas: 384 pocillos de una placa MaxiSorp se recubrieron con anticuerpo de recubrimiento (véase la tabla anterior) diluido en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBST y se bloquearon mediante la adición de 5% de MPBS a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 h a TA con agitación. A continuación, los lisados de E. coli diluidos procedentes de las placas de expresión se distribuyeron en cuatro placas de PCR de 96 pocillos (cada uno de aproximadamente 40 µl) y se expusieron a diferentes temperaturas (4°C (sobre hielo), 60°C, 70°C, 80°C y luego hielo) en un ciclador de PCR, cada temperatura durante 45 min. Las placas de 384 pocillos bloqueadas se lavaron con PBST, a continuación, los lisados de Fab incubados previamente, se añadieron a las placas. Las placas se incubaron a continuación 1 h a TA con agitación. Las placas se lavaron con PBST, se diluyeron los anticuerpos de detección marcados con AP en 0,5% de MPBS. Se añadieron 20 µl/pocillo de los anticuerpos de detección diluidos y se incubaron durante 1 h a TA mientras se agitaba suavemente. La señal fue identificada del modo siguiente: lavando los pocillos con TBST y añadiendo AttoPhos (1:5 diluido en ddH<sub>2</sub>O) a todos los pocillos. La señal se leyó en diferentes puntos de tiempo (5 min a 10 min) usando el programa Tecan (infiniTe F200), de PrimeScreen. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Ejemplo 6.5: ELISA de escrutinio de 400 combinaciones de VH/VL para determinar la estabilidad en suero de Fab en lisados de E. coli

20 Las placas de expresión se generaron como en el Ejemplo 6.3. Los lisados de E. coli que contenían Fab se diluyeron y se incubaron en suero bovino y de ratón usando las siguientes etapas: lisados de E. coli procedentes de las placas de expresión se diluyeron en 50% de suero (volumen total de 100 µl), se añadió 1:1000 de Cam para evitar el crecimiento de bacterias, y los lisados se dividieron en dos placas de 96 pocillos y se congelaron ambas placas. La primera placa se descongeló y se incubó a 37°C durante 12-13 días. La segunda placa se almacenó a -80°C hasta realizar el ELISA (0 días de incubación a 37°C). La Tabla 10 muestra los anticuerpos de recubrimiento sin marcar y 25 los anticuerpos de detección marcados con AP que se utilizaron.



Tabla 10:

	Nom- bre MOR	Marca- dor	Hospeda- dor	Anticuer- po	Empre- sa	Núme- ro	Concentra- ción	Dilu- ción	Lote
<b>Ab de recu- brimiento</b>	36	Fab	cabra	anti- IgG humana (H+L)	Jackson Immuno Rese- arch	109- 006- 088	1,3 mg/ml	1:1000	80299
<b>Ab de de- tección</b>	AP30	AP	cabra	anti- cadenas ligeras kappa humanas	Sigma	A3813	2,3 mg/ml	1:2300	018K606 9
<b>Ab de de- tección</b>	AP5	AP	cabra	anti- cadena ligera lambda humana; unido + libre	Sigma	A2904	0,8 mg/ml	1:800	096K603 0

El día 11 o 12, los 384 pocillos de una placa MaxiSorp se recubrieron con 20 µl de anticuerpo de recubrimiento diluido en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. El día siguiente, las placas se lavaron con PBST y se bloquearon mediante la adición de 5% de MPBS a cada pocillo e incubando durante 1-2 h a TA con agitación. A continuación, las placas de 384 pocillos bloqueadas se lavaron con PBST. Los lisados de E. coli en suero procedentes de las muestras de -80°C y 37°C, se transfirieron a las placas de ELISA recubiertas y se incubaron durante 1 hora a TA con agitación. Las placas se lavaron con PBST, y se diluyeron los anticuerpos de detección marcados con AP en 0,5% de MPBS. Se añadió anticuerpo de detección marcado con AP y la placa se incubó durante 1 h a TA con agitación. La señal fue identificada del modo siguiente: lavando los pocillos con TBST y añadiendo AttoPhos (diluido 1:5 en ddH<sub>2</sub>O) a todos los pocillos. La señal se leyó en diferentes puntos de tiempo (5 min a 10 min) usando el programa Tecan (infiniTe F200) de PrimeScreen. Los resultados de las pruebas de estabilidad en suero bovino se muestran en la Fig. 19. Los resultados de las pruebas de estabilidad en suero de ratón se muestran en la Tabla 12.

#### Ejemplo 7: Generación de IgG1 humana para la evaluación de las propiedades biofísicas

Para la generación de las 400 parejas de proteínas de la línea germinal de IgG1, los 20 genes de la cadena pesada de la región variable fueron subclonados en el vector de expresión de IgG1 humana pJP\_hlgG1f que se muestra en la Fig. 13. En paralelo, los 12 genes de kappa de la región variable se subclonaron en el vector de expresión de la cadena ligera kappa de mamífero pJP\_hlgkappa que se muestra en la Fig. 14 y los 8 genes de lambda de la región variable fueron subclonados en el vector de expresión de la cadena ligera lambda de mamífero pJP\_hlglambda2 que se muestra en la Fig. 15.

Mediante una cotransfección de cada uno, se puede producir un plásmido de expresión de la cadena pesada y uno de la cadena ligera para todas las 400 parejas de VH/VL por separado, clonando solamente 40 estructuras artificiales de expresión. Por lo tanto las células HEK.EBNA se cotransfectaron con todas las 20 estructuras artificiales de la cadena pesada y todas las 20 estructuras artificiales de expresión de la cadena ligera. La IgG1 humana se recogió o detectó varios días después de la transfección del material sobrenadante del cultivo celular.

#### Ejemplo 7.1: Clasificación de la expresión de IgG1

Uno de los criterios para que la selección de los emparejamientos de VH/VL se incluya en una colección es el nivel de expresión de los 400 emparejamientos de VH/VL diferentes en el formato IgG1. El nivel de expresión de cada emparejamiento de VH/VL en formato IgG1 humana se evaluó mediante ELISA de tipo sándwich. Por tanto, células HEK.EBNA se transfectaron con todas las 400 combinaciones de VH/VL en formato IgG1 humana y se expresaron a pequeña escala. El material sobrenadante del cultivo celular se recogió después de unos días y se determinaron los niveles de IgG.

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Placas de 384 pocillos de MaxiSorp<sup>TM</sup> se recubrieron con anti-IgG humana Fcy-pan de ratón R10Z8E9 a 2,5 µg/ml en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBST. Las placas se bloquearon con 5% de BSA o 1 x Chemiblocker en PBST y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y de nuevo se lavaron con PBST. El material sobrenadante de la expresión de IgG se diluyó en 2,5% de BSA-PBST y se añadieron las muestras diluidas a la placa de ELISA bloqueada y lavada. Se utilizaron los siguientes controles: material sobrenadante vacío y material sobrenadante con anticuerpo con una baja expresión, anticuerpo que se expresa de forma moderada y anticuerpo que se expresa de

forma elevada. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. A continuación, las placas se lavaron con TBST. Se añadió apropiadamente diluido un conjugado de anti-IgG humana de ratón Fcy-pan R10Z8E9 con biotina en 1% de BSA-TBST. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió estreptavidina-AP diluida 1:2000 en 0,5% de BSA-TBST y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió el sustrato de fluorescencia AttoPhos™ (preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante) diluido en TBST directamente antes del uso. Después de 5 y 10 min, se midió la fluorescencia a través de lector de microplacas Tecan.

Los rendimientos de la expresión relativa de IgG1 se calcularon dividiendo la señal de ELISA de la respectiva pareja de VH/VL por la señal de ELISA de la IgG1 de referencia MOR03080 (que se muestra en la Tabla 11). De ese modo, señales igualmente altas de ELISA dan como resultado un nivel de rendimiento de la expresión relativa de IgG1 de 1.

Tabla 11

La secuencia de aminoácidos de MOR03080 es del modo siguiente:

03080 Cadena pesada variable con CDRs en negrita:

(1) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GF****TFSSYGMH**WVRQAPGKGLEWVSN

(51) **IYSDGSNTFYADSVKGR**FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNM

(101) **YRWPFHYFFDYWG**QGTLVTSS (SEQ ID NO: 61)

03080 Cadena ligera variable con CDRs en negrita

(1) DIELTQPPSV SVAPGQTARIS**CGDNIGNKYV**SWYQQKPGQAPVVIY**GD**

(51) **NNRPSG**IPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY**CS****SYDSSYF**VFGGG

(101) TKLTVLGQ (SEQ ID NO: 62)

Los resultados se muestran en la Tabla 12. Las secuencias de la porción Fc se muestran en las Figuras 48, 50-51.

Ejemplo 7.2: Clasificación de la estabilidad en suero de IgG1

Uno de los criterios para la selección de los emparejamientos de cadena pesada variable y cadena ligera variable que debe incluirse en una colección, es la estabilidad en suero de los 400 diferentes emparejamientos de cadena pesada variable y cadena ligera variable en formato IgG1. La estabilidad en suero de cada material sobrenadante de anticuerpos IgG se evaluó mediante una incubación en suero de ratón al 50% durante 14 días y posteriormente un ELISA tipo sándwich con el clon de anti-IgG humana (CH2) de ratón, R10Z8E9. De nuevo todas las 400 combinaciones de VH/VL en formato IgG1 humana se transfectaron en células HEK.EBNA y se expresaron a pequeña escala. El material sobrenadante de los cultivos celulares se recogió después de pocos días y en las IgG del material sobrenadante se analizó la estabilidad en suero.

Se realizó el siguiente procedimiento. Placas de 384 pocillos de MaxiSorp™ se recubrieron con anti-IgG humana Fcy-pan de ratón R10Z8E9 a 2,5 µg/ml en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBST y después se bloquearon con 5% de BSA-PBST o 1 x Chemiblocker durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron con PBST. El material sobrenadante del cultivo celular que contenía IgG1 se diluyó a) en 2,5% de BSA-PBST y b) en 50% de suero de ratón y se incubó a 37°C durante al menos 14 días, y se añadieron esas muestras a la placa de ELISA bloqueada y lavada. Se utilizaron los siguientes controles: material sobrenadante vacío y material sobrenadante con anticuerpo con una baja expresión, un anticuerpo que se expresaba de forma moderada y un anticuerpo que se expresaba de forma elevada. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió conjugado de anti-IgG humana de ratón Fcy-pan R10Z8E9 con biotina diluido hasta 0,8 µg/ml en 1% de BSA-TBST. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió estreptavidina-AP diluida 1:2000 en 0,5% de BSA-TBST. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió el sustrato de fluorescencia AttoPhos™ (preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante) diluido 1:5 en TBST, directamente antes del uso. Después de 5 y 10 min, se midió la fluorescencia a través de lector de microplacas Tecan. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Ejemplo 8: Selección de las parejas de VH/VL con propiedades biofísicas favorables para la incorporación en la colección

Después de evaluar las 400 parejas de proteínas de la línea germinal para determinar las propiedades siguientes: a) presentación relativa después de la producción en fagos y ELISA para fagos en el formato Fab, b) rendimiento de la expresión relativa de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*; lisis celular en *E. coli* y detección con ELISA del Fab producido; c) estabilidad frente a la temperatura de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis celular en *E. coli* y detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de la incubación a temperaturas eleva-

5

das; d) estabilidad en suero bovino/ratón de Fab procedente de lisados de *E. coli* mediante la detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de la incubación en suero bovino/ratón; e) rendimiento de la expresión relativa de IgG1 humana después de la producción de IgG1 en células de mamífero y detección con ELISA de IgG1 secretada procedente del material sobrenadante de un cultivo de células; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 humana mediante detección con ELISA de IgG1 no desnaturalizada después de una incubación en suero bovino/ratón; después el siguiente paso fue seleccionar qué parejas de la línea germinal de VH/VL se iban a incorporar en la colección. Los resultados de las pruebas funcionales para cada pareja de proteínas de la línea germinal VH/VL se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Recopilación de los datos funcionales para cada una de las 400 parejas de proteínas de la línea germinal

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expresión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
1	hVH_1_2	hVK_1_05	0,1	0,0	bg	U	S	10	0,0	bg
2	hVH_1_2	hVK_1_06	0,1	0,2	60	S	S	42	0,0	bg
3	hVH_1_2	hVK_1_09	0,0	0,0	bg	U	S	11	0,0	bg
4	hVH_1_2	hVK_1_12	0,0	0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
5	hVH_1_2	hVK_1_16	0,1	0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
6	hVH_1_2	hVK_1_17	0,0	0,0	bg	S	S	21	0,0	bg
7	hVH_1_2	hVK_1_27	0,0	0,1	bg	S	S	22	0,0	bg
8	hVH_1_2	hVK_1_39	0,0	0,0	bg	S	S	21	0,0	bg
9	hVH_1_2	hVK_2_30		0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
10	hVH_1_2	hVK_3_11	0,0	0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
11	hVH_1_2	hVK_3_15	0,0	0,0	bg	U	S	10	0,0	bg
12	hVH_1_2	hVK_3_20		0,0	bg	S	S	21	0,0	bg
13	hVH_1_2	hVL_1-40						0	0,3	bg
14	hVH_1_2	hVL_1-47	0,0	0,0	4	U	U	2	0,0	bg
15	hVH_1_2	hVL_1-51	0,0	0,0	4	U	U	0	0,4	bg
16	hVH_1_2	hVL_2-11	0,1	0,0	4	S	S	22	0,3	bg
17	hVH_1_2	hVL_2-14	0,1	0,0	4	U	U	0	0,1	bg
18	hVH_1_2	hVL_2-23	0,0	0,0	4	U	U	0	0,0	bg
19	hVH_1_2	hVL_3-1	0,4	0,0	4	U	U	1	0,0	bg
20	hVH_1_2	hVL_3-21	0,0	0,0	4	U	U	0	0,0	bg
<b>21</b>	<b><u>hVH</u></b> <b><u>1_18</u></b>	<b><u>hVK 1_05</u></b>	<b><u>2,0</u></b>	<b><u>0,4</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>54</u></b>	<b><u>0,4</u></b>	<b><u>S</u></b>
22	hVH_1_18	hVK_1_06	0,6	0,5	60	S	S	56	0,2	S
23	hVH_1_18	hVK_1_09						0	0,1	S
24	hVH_1_18	hVK_1_12	1,6	0,5	60	S	S	56	0,1	bg
25	hVH_1_18	hVK_1_16	2,0					3	0,2	S
26	hVH_1_18	hVK_1_17		0,5		S	S	38	0,3	S
27	hVH_1_18	hVK_1_27	1,2	0,4	70	S	S	62	0,5	S
28	hVH_1_18	hVK_1_39	3,7	0,3	60	S	S	53	0,1	S
29	hVH_1_18	hVK_2_30	1,9	0,5	60	S	S	56	0,0	S
30	hVH_1_18	hVK_3_11		0,6	60	S	S	56	0,0	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
31	hVH_1_18	hVK_3_15	2,6	0,5	70	S	S	67	0,3	S
32	hVH_1_18	hVK_3_20	2,2	0,9	60	S	S	72	0,0	S
33	hVH_1_18	hVL_1-40	2,4					4	0,5	S
34	hVH_1_18	hVL_1-47		0,8	60	S	S	66	0,4	U
35	hVH_1_18	hVL_1-51						0	0,5	S
36	hVH_1_18	hVL_2-11	1,9					3	0,5	U
37	hVH_1_18	hVL_2-14	2,5	0,6	60	S	S	64	0,5	U
<b>38</b>	<b><u>hVH</u> <u>1_18</u></b>	<b><u>hVL_2-23</u></b>	<b><u>4,3</u></b>	<b><u>0,7</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>70</u></b>	<b><u>0,4</u></b>	<b><u>S</u></b>
39	hVH_1_18	hVL_3-1	4,4	0,6	60	S	S	65	0,2	U
40	hVH_1_18	hVL_3-21	3,4	0,6	60	S	S	64	0,2	S
41	hVH_1_46	hVK_1_05		0,4	60	S	S	51	0,9	S
42	hVH_1_46	hVK_1_06						0	0,9	S
<b>43</b>	<b><u>hVH 1_46</u></b>	<b><u>hVK 1_09</u></b>	<b><u>3,0</u></b>	<b><u>0,6</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>63</u></b>	<b><u>0,4</u></b>	<b><u>S</u></b>
44	hVH_1_46	hVK_1_12		0,5	60	S	S	55	0,2	S
45	hVH_1_46	hVK_1_16	1,3	0,6	60	S	S	61	0,3	S
46	hVH_1_46	hVK_1_17	1,3					2	0,5	S
47	hVH_1_46	hVK_1_27						0	0,6	S
<b>48</b>	<b><u>hVH 1_46</u></b>	<b><u>hVK 1_39</u></b>	<b><u>2,5</u></b>	<b><u>0,4</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>55</u></b>	<b><u>0,5</u></b>	<b><u>S</u></b>
49	hVH_1_46	hVK_2_30		0,2	4	U	S	16	0,0	S
50	hVH_1_46	hVK_3_11						0	0,1	S
<b>51</b>	<b><u>hVH</u> <u>1_46</u></b>	<b><u>hVK 3_15</u></b>	<b><u>3,0</u></b>	<b><u>0,7</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>68</u></b>	<b><u>0,4</u></b>	<b><u>S</u></b>
52	hVH_1_46	hVK_3_20						0	0,1	S
53	hVH_1_46	hVL_1-40		1,0	60	S	S	73	0,9	S
54	hVH_1_46	hVL_1-47						0	0,6	U
55	hVH_1_46	hVL_1-51	5,7					10	0,3	S
56	hVH_1_46	hVL_2-11	1,6					3	0,3	S
57	hVH_1_46	hVL_2-14						0	0,3	U
58	hVH_1_46	hVL_2-23	2,7	1,0	60	S	S	79	0,3	S
59	hVH_1_46	hVL_3-1	4,3					7	0,4	S
60	hVH_1_46	hVL_3-21	5,2					9	0,3	S
<b>61</b>	<b><u>hVH</u> <u>1_69* 01</u></b>	<b><u>hVK 1_05</u></b>	<b><u>2,1</u></b>	<b><u>0,5</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>59</u></b>	<b><u>0,9</u></b>	<b><u>S</u></b>
62	hVH_1_69 *01	hVK_1_06	2,9					5	0,5	S
63	hVH_1_69 *01	hVK_1_09		0,3	60	S	U	37	0,4	S
64	hVH_1_69	hVK_1_12	2,1	0,4	60	S	S	53	0,3	S

Nº	VH	VL	Presen- tación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
	*01									
65	hVH_1_69 *01	hVK_1_16	1,2					2	0,4	S
66	hVH_1_69 *01	hVK_1_17	0,9	0,3	4	S	S	31	0,3	S
67	hVH_1_69 *01	hVK_1_27	0,2	0,3	70	S	S	56	0,4	S
68	hVH_1_69 *01	hVK_1_39	3,5	0,1	4	S	S	31	0,4	U
69	hVH_1_69 *01	hVK_2_30						0	0,0	S
70	hVH_1_69 *01	hVK_3_11		0,7	60	S	S	60	0,0	S
71	hVH_1_69*01	hVK_3_15	1,6	0,5	70	S	S	66	0,5	S
72	hVH_1_69 *01	hVK_3_20		0,5	60	S	S	54	0,0	S
73	hVH_1_69*01	hVL_1-40		1,0	60	S	S	72	0,2	S
74	hVH_1_69 *01	hVL_1-47						0	0,2	U
75	hVH_1_69*01	hVL_1-51		0,8	60	S	S	64	0,3	S
76	hVH_1_69 *01	hVL_2-11	0,8	0,7	60	S	S	65	0,2	S
77	hVH_1_69 *01	hVL_2-14		0,8	60	S	S	64	0,3	U
78	hVH_1_69 *01	hVL_2-23	1,8					3	0,3	S
79	hVH_1_69 *01	hVL_3-1	3,4	0,7		S	S	52	0,2	S
80	hVH_1_69 *01	hVL_3-21	4,6	0,7	60	S	S	71	0,1	S
81	hVH_3_07	hVK_1_05		0,7	60	S	S	63	0,9	U
82	hVH_3_07	hVK_1_06		0,9	60	S	S	69	1,3	S
<b>83</b>	<b>hVH 3 07</b>	<b>hVK 1 09</b>	<b>6,7</b>	<b>0,4</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>50</b>	<b>1,5</b>	<b>S</b>
<b>84</b>	<b>hVH 3 07</b>	<b>hVK 1 12</b>	<b>10,6</b>	<b>0,9</b>	<b>70</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>97</b>	<b>0,9</b>	<b>S</b>
85	hVH_3_07	hVK_1_16	7,0					12	1,5	S
86	hVH_3_07	hVK_1_17	10,5	0,5	4	S	S	40	0,9	S
<b>87</b>	<b>hVH 3 07</b>	<b>hVK 1 27</b>	<b>14,5</b>	<b>0,5</b>	<b>70</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>87</b>	<b>1,8</b>	<b>S</b>
88	hVH_3_07	hVK_1_39	27,3	0,3	60	U	S	85	1,2	S
89	hVH_3_07	hVK_2_30	13,0					0	0,3	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expresión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
90	hVH_3_07	hVK_3_11						0	0,4	S
<b>91</b>	<b>hVH 3 07</b>	<b>hVK 3 15</b>	<b>14,5</b>	<b>0,7</b>	<b>70</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>95</b>	<b>1,8</b>	<b>S</b>
92	hVH_3_07	hVK_3_20						0	0,4	S
93	hVH_3_07	hVL_1-40	8,2					14	0,3	S
<b>94</b>	<b>hVH 3 07</b>	<b>hVL 1-47</b>	6,3	1,2	60	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>90</b>	<b>0,8</b>	<b>U</b>
95	hVH_3_07	hVL_1-51		1,0	60	S	S	74	0,9	S
96	hVH_3_07	hVL_2-11						0	1,2	S
97	hVH_3_07	hVL_2-14	11,3					19	0,8	U
<b>98</b>	<b>hVH 3 07</b>	<b>hVL 2-23</b>	<b>6,9</b>	<b>0,8</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>76</b>	<b>0,7</b>	<b>S</b>
<b>99</b>	<b>hVH 3 07</b>	<b>hVL 3-1</b>	<b>5,0</b>		<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>64</b>	<b>1,2</b>	<b>S</b>
100	hVH_3_07	hVL_3-21		0,7	60	S	S	61	0,3	S
<b>101</b>	<b>hVH 3 11</b>	<b>hVK 1 05</b>	<b>5,5</b>	<b>0,5</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>65</b>	<b>0,5</b>	<b>S</b>
<b>102</b>	<b>hVH 3 11</b>	<b>hVK 1 06</b>	<b>4,3</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>64</b>	<b>1,4</b>	<b>S</b>
103	hVH_3_11	hVK_1_09	6,7					0	0,9	S
<b>104</b>	<b>hVH 3 11</b>	<b>hVK 1 12</b>	<b>8,2</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>73</b>	<b>0,9</b>	<b>S</b>
<b>105</b>	<b>hVH 3 11</b>	<b>hVK 1 16</b>	<b>10,3</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>U</b>	<b>61</b>	<b>1,2</b>	<b>S</b>
106	hVH_3_11	hVK_1_17						0	0,9	S
107	hVH_3_11	hVK_1_27	6,0					0	1,7	S
108	hVH_3_11	hVK_1_39	29,0					50	1,8	S
109	hVH_3_11	hVK_2_30		0,4	4	S	S	34	1,1	U
110	hVH_3_11	hVK_3_11	0,0					0	0,6	S
<b>111</b>	<b>hVH 3 11</b>	<b>hVK 3 15</b>	<b>4,6</b>	<b>0,7</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	68	<b>1,6</b>	<b>S</b>
112	hVH_3_11	hVK_3_20						0	0,2	S
113	hVH_3_11	hVL_1-40	12,4					21	0,3	S
<b>114</b>	<b>hVH 3 11</b>	<b>hVL 1-47</b>	<b>8,1</b>	<b>0,8</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>80</b>	<b>1,3</b>	<b>U</b>
115	hVH_3_11	hVL_1-51		1,1	60	S	S	77	1,9	S
116	hVH_3_11	hVL_2-11	8,4					14	1,1	S
117	hVH_3_11	hVL_2-14	6,4	0,9	60	S	S	81	0,4	U
<b>118</b>	<b>hVH 3 11</b>	<b>hVL 2-23</b>	<b>8,9</b>	<b>1,0</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>88</b>	<b>0,4</b>	<b>S</b>
119	hVH_3_11	hVL_3-1		0,5	60	S	S	53	1,6	S
120	hVH_3_11	hVL_3-21	9,8					17	0,3	S
<b>121</b>	<b>hVH 3 15</b>	<b>hVK 1 05</b>	<b>8,1</b>	<b>0,5</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>68</b>	<b>0,4</b>	<b>S</b>
<b>122</b>	<b>hVH 3 15</b>	<b>hVK 1 06</b>	<b>11,7</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>79</b>	<b>0,8</b>	<b>S</b>
<b>123</b>	<b>hVH 3 15</b>	<b>hVK 1 09</b>	<b>10,0</b>	<b>0,5</b>	<b>70</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>80</b>	<b>0,9</b>	<b>S</b>
<b>124</b>	<b>hVH 3 15</b>	<b>hVK 1 12</b>	<b>11,5</b>	<b>0,7</b>	<b>70</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>90</b>	<b>0,7</b>	<b>S</b>
<b>125</b>	<b>hVH 3 15</b>	<b>hVK 1 16</b>	<b>14,5</b>	<b>0,7</b>	<b>68</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>86</b>	<b>1,5</b>	<b>S</b>
126	hVH_3_15	hVK_1_17	6,4	0,6	4	U	U	30	0,8	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
<b>127</b>	<b><u>hVH 3 15</u></b>	<b><u>hVK 1 27</u></b>	<b><u>7,8</u></b>	<b><u>0,5</u></b>	<b><u>70</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>77</u></b>	<b><u>1,7</u></b>	<b><u>S</u></b>
<b>128</b>	<b><u>hVH 3 15</u></b>	<b><u>hVK 1 39</u></b>	<b><u>14,2</u></b>	<b><u>0,4</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>76</u></b>	<b><u>1,8</u></b>	<b><u>S</u></b>
129	hVH_3_15	hVK_2_30		0,3	4	S	U	23	<u>0,6</u>	S
130	hVH_3_15	hVK_3_11	19,4					33	0,8	S
<b>131</b>	<b><u>hVH 3 15</u></b>	<b><u>hVK 3 15</u></b>	<b><u>12,1</u></b>	<b><u>0,6</u></b>	<b><u>70</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>70</u></b>	<b><u>1,9</u></b>	<b><u>S</u></b>
132	hVH_3_15	hVK_3_20	8,9					0	0,5	S
<b>133</b>	<b><u>hVH 3 15</u></b>	<b><u>hVL 1-40</u></b>	<b><u>16,7</u></b>	<b><u>0,9</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>98</u></b>	<b><u>0,1</u></b>	<b><u>S</u></b>
134	hVH_3_15	hVL_1-47	13,0	1,2	60	S	S	102	0,2	U
<b>135</b>	<b><u>hVH 3 15</u></b>	<b><u>hVL 1-51</u></b>	<b><u>11,0</u></b>	<b><u>1,1</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>94</u></b>	<b><u>0,9</u></b>	<b><u>S</u></b>
<b>136</b>	<b><u>hVH 3 15</u></b>	<b><u>hVL 2-11</u></b>	<b><u>10,5</u></b>	<b><u>0,9</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>88</u></b>	<b><u>0,8</u></b>	<b><u>S</u></b>
137	hVH_3_15	hVL_2-14	9,7	0,8	60	S	S	83	0,9	U
138	hVH_3_15	hVL_2-23	10,1					17	0,4	S
139	hVH_3_15	hVL_3-1	9,4	0,3	4	S	S	46	1,0	S
140	hVH_3_15	hVL_3-21	9,2	0,8		S	S	65	0,2	S
141	hVH_3_21	hVK_1_05	10,0					17	0,8	S
<b>142</b>	<b><u>hVH 3 21</u></b>	<b><u>hVK 1 06</u></b>	<b><u>16,1</u></b>	<b><u>1,0</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>99</u></b>	<b><u>0,9</u></b>	<b><u>S</u></b>
143	hVH_3_21	hVK_1_09						0	0,4	S
<b>144</b>	<b><u>hVH 3 21</u></b>	<b><u>hVK 1 12</u></b>	<b><u>11,3</u></b>	<b><u>0,6</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>77</u></b>	<b><u>0,5</u></b>	<b><u>S</u></b>
145	hVH_3_21	hVK_1_16		0,9	60	S	S	68	0,0	S
146	hVH_3_21	hVK_1_17	5,0					9	0,0	S
<b>147</b>	<b><u>hVH 3 21</u></b>	<b><u>hVK 1 27</u></b>	<b><u>8,7</u></b>	<b><u>0,6</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>78</u></b>	<b><u>0,5</u></b>	<b><u>S</u></b>
<b>148</b>	<b><u>hVH 3 21</u></b>	<b><u>hVK 1 39</u></b>	<b><u>11,6</u></b>	<b><u>0,5</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>54</u></b>	<b><u>0,8</u></b>	<b><u>S</u></b>
149	hVH_3_21	hVK_2_30		0,6	4	S	S	44	0,1	U
150	hVH_3_21	hVK_3_11						0	0,2	S
151	hVH_3_21	hVK_3_15		0,8	60	S	S	65	0,3	S
152	hVH_3_21	hVK_3_20						0	0,5	S
153	hVH_3_21	hVL_1-40		1,0	60	S	S	72	0,5	S
154	hVH_3_21	hVL_1-47	0,0	1,2	60	S	S	81	0,3	S
155	hVH_3_21	hVL_1-51						0	0,9	S
156	hVH_3_21	hVL_2-11		0,9	60	S	S	68	0,7	S
<b>157</b>	<b><u>hVH 3 21</u></b>	<b><u>hVL 2-14</u></b>	<b><u>6,5</u></b>	<b><u>0,9</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>81</u></b>	<b><u>1,2</u></b>	<b><u>S</u></b>
<b>158</b>	<b><u>hVH 3 21</u></b>	<b><u>hVL 2-23</u></b>	<b><u>8,8</u></b>	<b><u>1,0</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>90</u></b>	<b><u>0,9</u></b>	<b><u>S</u></b>
159	hVH_3_21	hVL_3-1		0,7	60	S	S	60	0,4	S
160	hVH_3_21	hVL_3-21	11,8	0,9	60	S	S	88	0,1	S
161	hVH_3_23	hVK_1_05		0,8	60	S	S	64	0,2	S
162	hVH_3_23	hVK_1_06		0,7	60	S	S	61	0,2	S

Nº	VH	VL	Presen- tación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
163	hVH_3_23	hVK_1_09	6,1	0,8	70	S	S	86	0,1	S
164	hVH_3_23	hVK_1_12		0,9	60	S	S	68	0,1	S
165	hVH_3_23	hVK_1_16	8,4	0,6	60	S	S	72	0,2	S
166	hVH_3_23	hVK_1_17		0,6	4	S	U	31	0,1	S
167	hVH_3_23	hVK_1_27	17,1					29	0,2	S
168	hVH_3_23	hVK_1_39	10,8					19	0,3	S
169	hVH_3_23	hVK_2_30	4,1	0,3	4	S	S	39	0,0	bg
170	hVH_3_23	hVK_3_11						0	0,0	bg
171	hVH_3_23	hVK_3_15		0,7	70	S	S	73	0,4	S
172	hVH_3_23	hVK_3_20	13,3					0	0,2	S
173	hVH_3_23	hVL_1-40						0	0,1	S
174	hVH_3_23	hVL_1-47						0	0,1	S
175	hVH_3_23	hVL_1-51	10,2	1,1	60	S	S	94	0,2	S
176	hVH_3_23	hVL_2-11	13,6					23	0,1	S
177	hVH_3_23	hVL_2-14	9,1					16	0,3	S
178	hVH_3_23	hVL_2-23	7,4	0,9	60	S	S	82	0,3	S
179	hVH_3_23	hVL_3-1	4,6	0,4	60	S	S	60	0,1	S
180	hVH_3_23	hVL_3-21	7,4	0,8	60	S	S	78	0,1	S
181	hVH_3_30	hVK_1_05						0	0,7	S
182	hVH_3_30	hVK_1_06		1,0	60	S	S	75	0,6	S
183	hVH_3_30	hVK_1_09						0	0,3	S
184	hVH_3_30	hVK_1_12	5,4	0,8	60	S	S	73	0,3	S
185	hVH_3_30	hVK_1_16		0,9	60	S	S	69	0,4	S
186	hVH_3_30	hVK_1_17						0	0,5	S
187	hVH_3_30	hVK_1_27	9,1	0,4	60	S	U	38	0,5	S
188	hVH_3_30	hVK_1_39	13,1	0,0	bg	U	U	19	1,0	S
189	hVH_3_30	hVK_2_30		0,4	4	S	U	23	0,1	bg
190	hVH_3_30	hVK_3_11		0,4	60	S	S	50	0,1	S
191	hVH_3_30	hVK_3_15		0,7	60	S	S	61	0,9	S
192	hVH_3_30	hVK_3_20		0,7	60	S	S	63	0,4	S
193	hVH_3_30	hVL_1-40						0	0,8	S
194	hVH_3_30	hVL_1-47		1,1	60	S	S	78	0,3	S
195	hVH_3_30	hVL_1-51						0	0,4	S
196	hVH_3_30	hVL_2-11		0,7	60	S	S	62	0,4	S
197	hVH_3_30	hVL_2-14		0,8	60	S	S	66	1,0	S
<b>198</b>	<b>hVH 3 30</b>	<b>hVL 2-23</b>	<b>9,5</b>	<b>1,0</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>89</b>	<b>0,5</b>	<b>S</b>
<b>199</b>	<b>hVH 3 30</b>	<b>hVL 3-1</b>	<b>8,8</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>73</b>	<b>0,5</b>	<b>S</b>



Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
200	hVH_3_30	hVL_3-21	16,6	0,8	60	S	S	93	0,2	S
201	hVH_3_33	hVK_1_05		0,3	60	S	S	46	0,0	S
202	hVH_3_33	hVK_1_06						0	0,6	S
203	hVH_3_33	hVK_1_09		0,7	60	S	S	60	0,2	S
204	hVH_3_33	hVK_1_12		0,2	60	S	U	34	0,2	S
205	hVH_3_33	hVK_1_16						0	0,4	S
206	hVH_3_33	hVK_1_17						0	0,5	S
207	hVH_3_33	hVK_1_27		0,6	60	S	S	57	0,2	S
208	hVH_3_33	hVK_1_39						0	0,8	S
209	hVH_3_33	hVK_2_30						0	0,3	S
210	hVH_3_33	hVK_3_11						0	0,6	S
<b>211</b>	<b>hVH 3 33</b>	<b>hVK 3 15</b>	<b>12,3</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>77</b>	<b>0,9</b>	<b>S</b>
212	hVH_3_33	hVK_3_20		1,0	60	S	S	72	0,3	S
213	hVH_3_33	hVL_1-40						0	1,0	S
214	hVH_3_33	hVL_1-47		1,1	60	S	S	77	0,4	S
215	hVH_3_33	hVL_1-51						0	0,6	S
216	hVH_3_33	hVL_2-11		0,5	60	S	S	54	0,5	S
217	hVH_3_33	hVL_2-14		0,9	4	S	S	53	0,9	S
<b>218</b>	<b>hVH 3 33</b>	<b>hVL 2-23</b>	<b>17,1</b>	<b>0,5</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>82</b>	<b>0,5</b>	<b>S</b>
219	hVH_3_33	hVL_3-1		0,2	60	S	S	44	0,7	S
220	hVH_3_33	hVL_3-21		0,8	60	S	S	67	0,5	S
221	hVH_3_48	hVK_1_05						0	0,6	S
222	hVH_3_48	hVK_1_06						0	0,7	S
223	hVH_3_48	hVK_1_09						0	0,2	S
224	hVH_3_48	hVK_1_12						0	0,3	S
225	hVH_3_48	hVK_1_16	8,7					15	0,5	S
226	hVH_3_48	hVK_1_17						0	0,5	S
<b>227</b>	<b>hVH 3 48</b>	<b>hVK 1 27</b>	<b>8,9</b>	<b>0,7</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>74</b>	<b>0,9</b>	<b>S</b>
228	hVH_3_48	hVK_1_39						0	0,5	S
229	hVH_3_48	hVK_2_30						0	0,3	S
230	hVH_3_48	hVK_3_11						0	0,7	S
231	hVH_3_48	hVK_3_15	12,1					21	0,3	S
232	hVH_3_48	hVK_3_20		0,8	60	S	S	65	0,4	S
233	hVH_3_48	hVL_1-40		0,8		S	S	51	0,6	S
234	hVH_3_48	hVL_1-47	10,3					18	0,4	S
235	hVH_3_48	hVL_1-51		1,2	60	S	S	80	0,7	S
236	hVH_3_48	hVL_2-11						0	0,6	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
237	hVH_3_48	hVL_2-14						0	0,6	S
238	hVH_3_48	hVL_2-23	9,3					16	0,5	S
239	hVH_3_48	hVL_3-1	6,0	0,8		S	S	61	0,5	S
240	hVH_3_48	hVL_3-21						0	0,3	S
241	hVH_3_53	hVK_1_05	11,1	0,7	4	U	S	60	0,8	S
242	hVH_3_53	hVK_1_06		0,7	60	S	S	63	0,7	S
<b>243</b>	<b>hVH 3 53</b>	<b>hVK 1 09</b>	<b>8,3</b>	<b>0,9</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>83</b>	<b>0,4</b>	<b>S</b>
<b>244</b>	<b>hVH 3 53</b>	<b>hVK 1 12</b>	<b>14,8</b>	<b>0,7</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>60</b>	<b>0,2</b>	<b>S</b>
245	hVH_3_53	hVK_1_16	10,7	0,0	bg	bg	U	20	0,3	S
246	hVH_3_53	hVK_1_17	2,9	0,5	4	S	S	42	0,5	S
247	hVH_3_53	hVK_1_27	6,9	0,4	60	S	S	62	0,2	S
248	hVH_3_53	hVK_1_39		0,6	60	S	S	56	0,2	S
249	hVH_3_53	hVK_2_30	1,3	0,3	4	S	S	32	0,0	bg
250	hVH_3_53	hVK_3_11		0,8	60	S	S	64	0,3	S
251	hVH_3_53	hVK_3_15	9,6	0,7	60	S	S	63	0,5	S
252	hVH_3_53	hVK_3_20		0,3	4	S	S	32	0,3	S
253	hVH_3_53	hVL_1-40		1,1	4	S	S	60	1,1	S
254	hVH_3_53	hVL_1-47		1,1	60	S	S	79	0,2	S
<b>255</b>	<b>hVH 3 53</b>	<b>hVL 1-51</b>	<b>6,4</b>	<b>1,3</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>96</b>	<b>0,4</b>	<b>S</b>
256	hVH_3_53	hVL_2-11	7,2	0,8	60	S	S	78	0,3	S
257	hVH_3_53	hVL_2-14		1,0	60	S	S	75	0,8	S
<b>258</b>	<b>hVH 3 53</b>	<b>hVL 2-23</b>	<b>6,3</b>	<b>1,1</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>86</b>	<b>0,6</b>	<b>S</b>
<b>259</b>	<b>hVH 3 53</b>	<b>hVL 3-1</b>	<b>5,1</b>	<b>0,6</b>	<b>68</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>67</b>	<b>0,5</b>	<b>S</b>
260	hVH_3_53	hVL_3-21		0,8	60	S	S	66	0,5	S
261	hVH_3_73	hVK_1_05	0,4	0,2	60	S	S	45	1,1	S
262	hVH_3_73	hVK_1_06	0,3	0,2	60	S	S	45	1,0	S
263	hVH_3_73	hVK_1_09	0,3	0,1	60	S	S	39	0,9	S
264	hVH_3_73	hVK_1_12	0,3	0,1	60	S	S	38	0,5	S
265	hVH_3_73	hVK_1_16	0,3	0,2	60	S	S	44	1,1	S
266	hVH_3_73	hVK_1_17	0,1					0	1,0	S
267	hVH_3_73	hVK_1_27	3,6	0,1	4	S	S	24	0,9	S
268	hVH_3_73	hVK_1_39	0,2	0,2	4	S	S	27	0,8	S
269	hVH_3_73	hVK_2_30		0,1	bg	S	S	22	0,3	S
270	hVH_3_73	hVK_3_11	0,5					0	0,2	S
271	hVH_3_73	hVK_3_15	0,2	0,1	60	S	S	39	0,1	S
272	hVH_3_73	hVK_3_20						0	1,1	S
273	hVH_3_73	hVL_1-40		0,1	60	S	S	40	1,2	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
274	hVH_3_73	hVL_1-47	0,0	0,3	4	S	S	31	0,8	S
275	hVH_3_73	hVL_1-51	0,3	0,2	60	S	S	44	0,7	S
276	hVH_3_73	hVL_2-11	0,2	0,2	4	S	S	26	0,8	S
277	hVH_3_73	hVL_2-14						0	0,4	S
278	hVH_3_73	hVL_2-23	0,8					1	0,1	S
279	hVH_3_73	hVL_3-1	0,0	0,1	60	S	S	39	1,0	S
280	hVH_3_73	hVL_3-21	0,4	0,2	60	S	S	43	1,1	S
281	hVH_3_74	hVK_1_05	6,4					11	0,6	S
<b>282</b>	<b>hVH 3 74</b>	<b>hVK 1 06</b>	<b>9,5</b>	<b>0,9</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>86</b>	<b>1,0</b>	<b>S</b>
<b>283</b>	<b>hVH 3 74</b>	<b>hVK 1 09</b>	<b>8,7</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>74</b>	<b>0,5</b>	<b>S</b>
284	hVH_3_74	hVK_1_12	8,4	0,6	60	S	S	74	0,0	S
285	hVH_3_74	hVK_1_16	8,0					11	0,8	S
286	hVH_3_74	hVK_1_17		0,6	60	S	S	58	0,2	S
<b>287</b>	<b>hVH 3 74</b>	<b>hVK 1 27</b>	<b>5,0</b>	<b>0,6</b>	<b>70</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>77</b>	<b>1,1</b>	<b>S</b>
288	hVH_3_74	hVK_1_39	8,7					15	0,3	S
289	hVH_3_74	hVK_2_30		0,4		S	S	37	0,7	S
290	hVH_3_74	hVK_3_11						0	0,1	S
<b>291</b>	<b>hVH 3 74</b>	<b>hVK 3 15</b>	<b>10,0</b>	<b>0,8</b>	<b>70</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>94</b>	<b>1,0</b>	<b>S</b>
292	hVH_3_74	hVK_3_20		0,7	60	S	S	62	0,6	S
293	hVH_3_74	hVL_1-40	8,8	0,4	4	S	S	51	1,3	S
294	hVH_3_74	hVL_1-47	3,2	1,2		S	S	72	0,6	S
<b>295</b>	<b>hVH 3 74</b>	<b>hVL 1-51</b>	<b>7,1</b>	<b>1,1</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>91</b>	<b>1,2</b>	<b>S</b>
296	hVH_3_74	hVL_2-11		0,6	60	S	S	59	0,8	S
297	hVH_3_74	hVL_2-14	4,7					8	0,6	S
298	hVH_3_74	hVL_2-23						0	1,0	S
299	hVH_3_74	hVL_3-1	7,0	0,6	60	S	S	70	0,3	S
300	hVH_3_74	hVL_3-21	1,8	0,6	60	S	S	60	0,3	S
301	hVH_4_04 *03	hVK_1_05		0,8	60	S	S	67	0,6	S
302	hVH_4_04 *03	hVK_1_06		0,8	60	S	S	64	1,1	S
303	hVH_4_04 *03	hVK_1_09	4,5	0,1	bg	S	S	30	0,6	S
304	hVH_4_04 *03	hVK_1_12		0,7	60	S	S	61	0,8	S
305	hVH_4_04 *03	hVK_1_16	3,2	0,2	60	S	S	48	0,4	S
306	hVH_4_04 *03	hVK_1_17		0,4	4	S	S	34	0,8	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
307	hVH_4_04 *03	hVK_1_27		0,4	60	S	S	48	0,9	S
308	hVH_4_04 *03	hVK_1_39		0,2	bg	S	S	26	1,0	S
309	hVH_4_04 *03	hVK_2_30	0,3	0,5	4	S	S	38	0,2	U
310	hVH_4_04 *03	hVK_3_11		0,6	bg	S	S	43	0,3	S
311	hVH_4_04 *03	hVK_3_15		0,6	60	S	S	58	1,1	S
312	hVH_4_04 *03	hVK_3_20		1,1	60	S	U	65	1,1	S
313	hVH_4_04 *03	hVL_1-40		1,0	60	S	S	75	0,9	S
314	hVH_4_04 *03	hVL_1-47	8,3					14	0,4	S
315	hVH_4_04 *03	hVL_1-51		0,9	60	S	S	71	0,6	S
316	hVH_4_04 *03	hVL_2-11		1,0	60	S	S	73	0,7	S
317	hVH_4_04 *03	hVL_2-14		0,7	60	S	S	63	0,4	S
<b>318</b>	<b><u>hVH 4 04</u></b> <b><u>*03</u></b>	<b><u>hVL 2-23</u></b>	<b><u>2,7</u></b>	<b><u>1,0</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>77</u></b>	<b><u>0,7</u></b>	<b><u>S</u></b>
<b>319</b>	<b><u>hVH 4 04</u></b> <b><u>*03</u></b>	<b><u>hVL 3-1</u></b>	<b><u>2,2</u></b>	<b><u>0,6</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>63</u></b>	<b><u>1,3</u></b>	<b><u>S</u></b>
<b>320</b>	<b><u>hVH 4 04</u></b> <b><u>*03</u></b>	<b><u>hVL 3-21</u></b>	<b><u>5,2</u></b>	<b><u>0,7</u></b>	<b><u>60</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>69</u></b>	<b><u>0,5</u></b>	<b><u>S</u></b>
321	hVH_4_31	hVK_1_05		0,0	bg	S	S	21	0,0	bg
322	hVH_4_31	hVK_1_06						0	0,2	bg
323	hVH_4_31	hVK_1_09		0,1	4	S	S	23	0,6	S
324	hVH_4_31	hVK_1_12		0,1	60	S	S	37	0,4	S
325	hVH_4_31	hVK_1_16		0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
326	hVH_4_31	hVK_1_17		0,0	bg	U	bg	1	0,2	bg
327	hVH_4_31	hVK_1_27		0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
328	hVH_4_31	hVK_1_39		0,8	60	S	S	65	0,5	S
329	hVH_4_31	hVK_2_30		0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
330	hVH_4_31	hVK_3_11						0	0,0	bg
331	hVH_4_31	hVK_3_15		0,1	bg	S	S	24	0,1	S
332	hVH_4_31	hVK_3_20						0	0,4	S
333	hVH_4_31	hVL_1-40	0,0	0,6	60	S	S	57	0,8	S
334	hVH_4_31	hVL_1-47	0,0	0,7	60	S	S	62	0,1	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expre- sión relativa de Fab	Termoes- tabilidad de Fab	Estabi- lidad de Fab en suero de ratón	Estabi- lidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasifi- cación de Fab	Expre- sión relativa de IgG1	Estabi- lidad de IgG1 en suero bovino
335	hVH_4_31	hVL_1-51		0,9	60	S	S	70	0,3	S
336	hVH_4_31	hVL_2-11		0,5	60	S	S	55	0,2	S
337	hVH_4_31	hVL_2-14	0,0					0	0,5	S
338	hVH_4_31	hVL_2-23		0,0	60	S	S	37	0,3	S
339	hVH_4_31	hVL_3-1	1,4	0,3	60	S	S	50	1,3	S
340	hVH_4_31	hVL_3-21		0,4	60	S	S	50	0,4	bg
341	hVH_4_39	hVK_1_05	0,0	0,3	60	S	S	45	0,3	S
342	hVH_4_39	hVK_1_06	1,6					3	0,8	S
343	hVH_4_39	hVK_1_09		0,5	4	S	S	37	0,7	S
344	hVH_4_39	hVK_1_12						0	0,9	S
345	hVH_4_39	hVK_1_16						0	0,5	S
346	hVH_4_39	hVK_1_17	0,7	0,3	4	S	S	33	1,0	S
347	hVH_4_39	hVK_1_27						0	0,4	S
348	hVH_4_39	hVK_1_39	2,1	0,3	60	S	S	48	1,2	S
349	hVH_4_39	hVK_2_30		0,2	4	S	S	27	0,2	S
350	hVH_4_39	hVK_3_11		0,3	60	S	S	48	0,2	S
351	hVH_4_39	hVK_3_15		0,6	70	S	S	68	1,0	S
352	hVH_4_39	hVK_3_20		0,6	60	S		49	1,2	S
353	hVH_4_39	hVL_1-40	0,6	0,9	70	S	S	81	1,1	S
354	hVH_4_39	hVL_1-47		0,7	70	S	S	72	0,3	S
355	hVH_4_39	hVL_1-51		0,8	60	S	S	65	0,5	S
356	hVH_4_39	hVL_2-11						0	0,3	S
<b>357</b>	<b>hVH 4 39</b>	<b>hVL 2-14</b>	<b>2,0</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>63</b>	<b>0,5</b>	<b>S</b>
358	hVH_4_39	hVL_2-23	0,9	0,7	60	S	S	62	0,4	S
<b>359</b>	<b>hVH 4 39</b>	<b>hVL 3-1</b>	<b>3,6</b>	<b>0,5</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>59</b>	<b>0,9</b>	<b>S</b>
360	hVH_4_39	hVL_3-21		0,6	60	S	S	57	0,6	S
361	hVH_5_51	hVK_1_05		0,5	60	S	S	52	0,4	S
362	hVH_5_51	hVK_1_06		0,5	60	S	S	54	0,9	S
<b>363</b>	<b>hVH 5 51</b>	<b>hVK 1 09</b>	<b>2,6</b>	<b>0,5</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>57</b>	<b>0,5</b>	<b>S</b>
364	hVH_5_51	hVK_1_12	1,8					3	0,8	S
365	hVH_5_51	hVK_1_16	1,3					2	0,5	S
366	hVH_5_51	hVK_1_17		0,3	4	S	S	32	0,6	S
367	hVH_5_51	hVK_1_27	0,4	0,2	60	S	S	43	1,0	S
368	hVH_5_51	hVK_1_39	3,7	0,3	60	S	S	51	1,2	S
369	hVH_5_51	hVK_2_30	0,9	0,2	4	S		19	0,7	S
370	hVH_5_51	hVK_3_11		1,0	60	S		62	0,6	S
371	hVH_5_51	hVK_3_15	1,9					3	1,2	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (Cys- Display)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
372	hVH_5_51	hVK_3_20						0	1,1	S
373	hVH_5_51	hVL_1-40		1,0	60	S	S	72	1,3	S
374	hVH_5_51	hVL_1-47		1,0	60	S	S	73	0,8	S
375	hVH_5_51	hVL_1-51		1,1	60	S	S	77	0,5	S
376	hVH_5_51	hVL_2-11	0,0	0,7	60	S	S	63	0,3	S
377	hVH_5_51	hVL_2-14	2,1					4	0,8	S
<b>378</b>	<b>hVH 5 51</b>	<b>hVL 2-23</b>	<b>3,0</b>	<b>1,0</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>79</b>	<b>0,7</b>	<b>S</b>
<b>379</b>	<b>hVH 5 51</b>	<b>hVL 3-1</b>	<b>3,8</b>	<b>0,7</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>67</b>	<b>1,3</b>	<b>S</b>
380	hVH_5_51	hVL_3-21						0	0,7	S
381	hVH_6_1	hVK_1_05		0,7	60	S	S	62	0,0	S
<b>382</b>	<b>hVH 6 1</b>	<b>hVK 1 06</b>	<b>3,3</b>	<b>0,6</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>64</b>	<b>1,2</b>	<b>S</b>
383	hVH_6_1	hVK_1_09	5,9					10	1,3	S
384	hVH_6_1	hVK_1_12	1,5	0,0	bg	U	S	13	1,1	S
385	hVH_6_1	hVK_1_16						0	1,4	S
386	hVH_6_1	hVK_1_17		0,5	60	S	S	54	1,3	S
387	hVH_6_1	hVK_1_27		0,5	70	S	S	63	1,2	S
388	hVH_6_1	hVK_1_39		0,3	60	S	S	45	1,1	S
389	hVH_6_1	hVK_2_30		0,3	4	S	S	32	0,3	S
390	hVH_6_1	hVK_3_11						0	0,9	S
391	hVH_6_1	hVK_3_15		0,7	70	S	S	70	1,3	S
392	hVH_6_1	hVK_3_20		0,9	60	S	S	70	1,3	S
393	hVH_6_1	hVL_1-40	7,2					12	1,4	S
394	hVH_6_1	hVL_1-47		1,1	60	S	S	75	0,2	S
395	hVH_6_1	hVL_1-51		1,1	60	S	S	75	0,5	S
396	hVH_6_1	hVL_2-11	1,0	1,0	60	S	S	73	0,2	S
397	hVH_6_1	hVL_2-14						0	0,4	S
<b>398</b>	<b>hVH 6 1</b>	<b>hVL 2-23</b>	<b>2,1</b>	<b>0,8</b>	<b>60</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>69</b>	<b>9,4</b>	<b>S</b>
399	hVH_6_1	hVL_3-1		0,5	60	S	S	55	1,4	S
400	hVH_6_1	hVL_3-21	0,4	0,8	60	S	S	66	0,5	S

Claves de la Tabla 12:

Para la presentación relativa de Fab, la expresión relativa de Fab y la expresión relativa de IgG1, los valores ilustran los niveles en comparación con un control. Los números más altos indican niveles más altos.

- 5 Para la termoestabilidad de Fab, los números 60 y 70 indican las parejas de VH/VL que son estables durante 45 minutos a 60°C o 70°C en las condiciones del ensayo. El número 4 indica parejas inestables frente a la temperatura y bg (ruido de fondo, del inglés "background") indica niveles bajos de expresión.

Para la estabilidad de Fab en suero de ratón, la estabilidad de Fab en suero bovino y la estabilidad de IgG1 en suero bovino, S significa estable, U inestable y bg ruido de fondo, en las condiciones del ensayo.

Como se ha descrito en los ejemplos anteriores, los genes de la línea germinal de VH y VL predominantes y las parejas de genes de la línea germinal de VH/VL predominantes se identificaron a partir del repertorio inmune humano, después las secuencias de proteínas de la línea germinal de VH y VL predominantes se analizaron *in silico* con el fin de identificar y seleccionar secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que tienen propiedades biofísicas favorables. Como se muestra en la Tabla 5 y las Figuras 2-3, en general, se seleccionaron las 20 VH mejores, las 8 VL mejores y las 12 Vk mejores para la síntesis, la combinación y el análisis funcional subsiguiente. Las secuencias de genes de la línea germinal se sintetizaron y luego se combinaron con el fin de generar 400 parejas de proteínas de la línea germinal que son representativas de las parejas de genes de la línea germinal abundantes, expresadas en el repertorio inmune humano. Las 400 parejas de proteínas de la línea germinal de VH/VL se sometieron a ensayo para determinar las siguientes propiedades: a) presentación relativa después de la producción en fagos y ELISA para fagos en el formato Fab, b) rendimiento de la expresión relativa de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*; lisis celular en *E. coli* y detección con ELISA del Fab producido; c) estabilidad frente a la temperatura de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis celular en *E. coli* y la detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de la incubación a temperaturas elevadas; d) estabilidad en suero bovino/ratón de Fab procedente de lisados de *E. coli* mediante la detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de la incubación en suero bovino/ratón; e) rendimiento de la expresión relativa de IgG1 humana después de la producción de IgG1 en células de mamífero y detección con ELISA de IgG1 secretada procedente de material sobrenadante de un cultivo de células; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 humana mediante detección con ELISA de IgG1 no desnaturalizada e incubación en suero bovino/ratón.

Con el uso de los datos proporcionados en la Tabla 12, un experto en la técnica podría identificar fácilmente las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen propiedades biofísicas favorables.

En general, se seleccionaron las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen un valor umbral en cada propiedad funcional para su incorporación en las colecciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se seleccionaron parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden la totalidad de las siguientes propiedades para su incorporación en una colección: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% mejor de los Fabs en la muestra; ii) un rendimiento de la expresión en formato Fab de al menos 0,4, en comparación con Fab VH1-69 VLA\_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un rendimiento de la expresión en formato IgG de al menos 0,4, en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero en formato IgG durante catorce días a 37°C. La Tabla 32 muestra en **negrita y subrayadas** las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden la totalidad de esas propiedades funcionales.

Como se ha descrito anteriormente, sin embargo, las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen una o varias de las propiedades funcionales se pueden seleccionar para su incorporación en colecciones. En este caso, se ha creado una clasificación total de las 400 parejas de proteínas de la línea germinal del ensayo, de manera que cada pareja de proteínas de la línea germinal se pudiera clasificar respecto a otra para dar valor a cada una de las propiedades funcionales del ensayo. Esto permitió a los inventores seleccionar una o varias parejas de proteínas de la línea germinal que tenían una o más o todas las propiedades funcionales enumeradas. En algunas realizaciones, las colecciones comprenden todas las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen las características anteriores. En algunas realizaciones, la colección comprende las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen la puntuación total más alta de las 400 parejas del ensayo. En algunas realizaciones, las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen puntuaciones totales dentro del 10% mejor, 20% mejor o 30% mejor de las 400 parejas del ensayo, se seleccionaron para su incorporación en las colecciones.

#### Ejemplo 9: Prueba adicional de ~ 100 parejas de VH/VL

De las 400 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo anteriormente (resultados mostrados en la Tabla 12), 95 fueron seleccionadas para una prueba adicional. La prueba anterior de las 400 parejas de proteínas de la línea germinal para estudiar la presentación, el rendimiento de la expresión, la estabilidad térmica y en suero, sirvió como un filtro preliminar para eliminar las parejas de proteínas de la línea germinal que no tenían las características que se consideraban favorables para un desarrollo terapéutico. El objetivo era seleccionar un subgrupo de parejas de proteínas de la línea germinal que tenían características favorables para la capacidad de desarrollo, mientras que al mismo tiempo conservaban un nivel elevado de diversidad dentro de una colección, de modo que la colección se podía utilizar para identificar candidatos con capacidad de desarrollo contra cualquier antígeno.

La Tabla 12 muestra ~60 parejas de proteínas de la línea germinal en negrita y subrayadas que habían alcanzado los valores umbrales de una realización de la descripción. De las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas para la prueba adicional, algunas se eligieron porque cumplían los criterios anteriores, y era deseable someterlas a ensayo adicionalmente. Otras se eligieron, a pesar de no alcanzar ciertos umbrales, de modo que esas parejas se podían evaluar de nuevo. Una vez más, uno de los objetivos de la presente descripción es proporcionar una colección diversa que se pueda utilizar para identificar anticuerpos o fragmentos contra cualquier antígeno. Las 95 parejas de proteínas de la línea germinal que se muestran en las Figuras 16-24 se sintetizaron como se ha descrito en el Ejemplo 5. Después de la síntesis y la expresión en formatos Fab e IgG1, las 95 parejas de proteínas de la línea germinal se sometieron a ensayo adicionalmente en formato Fab e IgG1 para estudiar lo siguiente a) rendimiento de la expresión de Fab purificado en mg/L (cultivo de expresión), b) contenido monomérico de Fab purificado

(% de monómero), c) estabilidad térmica de Fab purificado en °C, d) rendimiento de la expresión de IgG1 purificada en mg/L (cultivo celular), e) contenido monomérico de IgG1 purificada (% de monómero), f) estabilidad térmica de IgG1 purificada en °C, g) punto isoeléctrico de IgG1 y h) pruebas de estrés de IgG con exposición a ácido, incluyendo fluorometría de barrido diferencial (DSF), absorción, dispersión de luz dinámica y tinción de partículas.

## 5 Ejemplo 9.1 Prueba de Fab purificado

Los fragmentos Fab que representaban cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionados para la prueba adicional, se expresaron en E. coli y se purificaron. La expresión de los fragmentos Fab en células E. coli TG-1 F se llevó a cabo en cultivos de 500 ml de medio 2xYT complementado con 0,1% de glucosa y cloranfenicol. Los cultivos se agitaron hasta que la DO<sub>600nm</sub> alcanzó 0,5. La expresión de Fab fue inducida por la adición de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) y continuando el cultivo por la noche. Las células se recogieron y se rompieron usando lizozima. Los fragmentos Fab marcados con His6 (SEQ ID NO: 203) se aislaron por medio de IMAC (Bio-Rad, Múnich, Alemania) y eluyeron utilizando imidazol. El cambio de tampón a 1X PBS de Dulbecco (pH 7,2, Invitrogen, Darmstadt, Alemania) se realizó utilizando columnas PD10 (GE Healthcare, Múnich, Alemania). Las muestras se filtraron de forma estéril (0,2 μm).

### 15 Ejemplo 9.1.1 Determinación del rendimiento de la expresión de Fab purificado

Las concentraciones de proteína de los fragmentos Fab purificados representan cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal determinadas por espectrofotometría UV (Nanodrop, Peqlab, Erlangen, Alemania). El coeficiente de extinción usado era 1,538 ml/mg y se midió la absorbancia a 280 nm. Los resultados se muestran en las Figuras 16-18.

### 20 Ejemplo 9.1.2 Determinación de la estabilidad térmica de Fab purificado

La estabilidad térmica de los fragmentos Fab purificados que representaban cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal se determinaron mediante fluorometría de barrido diferencial (DSF). La fluorometría de barrido diferencial (DSF) es una técnica basada en un colorante de fluorescencia que controla la falta de plegamiento térmico (punto de fusión) de una proteína de interés. Los cambios en la fluorescencia de un colorante hidrófobo que interacciona con las cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos de la proteína desplegada, se controlan a través de una rampa de temperatura.

Se utilizaron los siguientes materiales: colorante fluorescente Sypro Orange (Sigma, #S5692); placas de PCR de iCycler iQ, de 96 pocillos (BioRad, #2239441); adhesivo sellador Microseal B (Biorad #MSB-1001); lecho óptico de 96 pocillos (Biorad, #ADR3296); termociclador iCycler iQ5 (Biorad) y D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.).

El colorante Sypro Orange diluido se añadió a cada pocillo de una placa de PCR de iCycler iQ de 96 pocillos y las muestras se sometieron a ensayo a una concentración final de al menos 0,1 mg/ml. Se usó el termociclador iCycler iQ5 (Biorad) para la prueba. Se realizó un barrido de la temperatura desde 20°C a 95°C con una tasa de calentamiento de 60°C/h, y la temperatura de la falta de plegamiento se calculó mediante un análisis del punto medio de la transición de fluorescencia. Los resultados se muestran en las Figuras 16-18 en la columna ThermoFluor de Fab purificado.

### Ejemplo 9.1.3 Separación de Fab purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño

El contenido monomérico (% de monómero) de fragmentos Fab purificados que representaban cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal, se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La SEC se realizó en un sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare Europe GmbH, Friburgo, Alemania). Para la separación se utilizó una columna Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare Europe GmbH, Friburgo, Alemania). Para cada muestra se cargaron 10 μl de proteína en la columna, la separación se realizó con un caudal de 0,05 ml/min y se registró mediante el análisis de la absorción UV a 260 y 280 nm. El tampón de ejecución estaba compuesto por D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). Los resultados se muestran en las Figuras 16-18.

## 45 Ejemplo 9.2 Expresión y purificación de IgG1

Las IgG1s que representaban cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas para una prueba adicional, se expresaron en células HKB11. Las células HKB11 eucariotas se transfectaron con una relación 1:1 de ADN del vector de expresión de la cadena pesada y ligera de IgG. El material sobrenadante del cultivo celular se recogió del día 3 al 4 después de la transfección y se sometió a cromatografía de afinidad con proteína A (Mab-Select SURE, GE Healthcare, Múnich, Alemania). El cambio de tampón se realizó con PBS 1 x de Dulbecco (pH 7,2, Invitrogen, Darmstadt, Alemania) y las muestras se filtraron de forma estéril (tamaño de poro 0,2 μm).

### Ejemplo 9.2.1 Determinación del rendimiento de la expresión de IgG1 purificada

Las concentraciones proteicas de IgG1s purificadas que representaban cada una de los 95 parejas de proteínas de la línea germinal, se determinaron por espectrofotometría UV (Nanodrop, Peqlab, Erlangen, Alemania). El coeficiente



de extinción usado era 1,369 ml/mg y se midió la absorbancia a 280 nm. Los resultados se muestran en las Figuras 16-18.

#### Ejemplo 9.2.2 Determinación de la estabilidad térmica de IgG1 purificada

5 La estabilidad térmica de IgG1 de las IgG1s purificadas se determinó mediante fluorometría de barrido diferencial (DSF) como se describe en el método 9.1.2. Los valores mostrados para cada IgG representan los eventos de falta de plegamiento que tienen lugar dentro de las regiones variables de la IgG. Los valores que representan una falta de plegamiento de la porción Fc no se muestran, ya que generalmente son idénticos para cada IgG1 humana. Los resultados se muestran en las Figuras 16-18.

#### Ejemplo 9.2.3 Separación de la IgG1 purificada mediante cromatografía de exclusión por tamaño

10 El contenido monomérico (% de monómero) de IgG1 purificada que representaba cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal, se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La HP-SEC se realizó en un sistema de HPLC Dionex UltiMate 3000 Titanium (Dionex Corporation, Germering, Alemania) en combinación con Wyatt miniDAWN Treos y Wyatt Optilab rEX (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Alemania). Para la separación se utilizó una columna Tosoh TSK-Gel G3000SWxl (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania). Para cada muestra se cargaron 15 µg de proteína en la columna, la separación se realizó con un caudal de 0,5 ml/min y se registró analizando la absorción UV a 280 nm. El tampón de ejecución estaba compuesto por D-PBS de Gibco, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). Los resultados se muestran en las Figuras 16-18.

#### Ejemplo 9.2.4 Cálculo del punto isoelectrico (pI) de IgG1 purificada

20 Se calculó el punto isoelectrico de cada pareja de proteínas de la línea germinal en formato IgG1. Los métodos para determinar el pI de una proteína son conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden emplear las siguientes herramientas: [http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html); Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, California). Los resultados se muestran en las Figuras 16-18.

#### Ejemplo 9.2.5 Prueba de estrés de IgG1 purificada con exposición a ácido

25 Como una etapa de la inactivación de virus es un proceso estándar, durante el procesamiento posterior (DSP) de Química, Fabricación y Control (CMC), se puso a prueba la capacidad de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal para soportar la exposición a ácido mediante la reducción del pH y registrando los datos sensibles a la agregación para cada una de las IgG1s. Cada una de las parejas de proteínas de la línea germinal se suministró en formato de placa de 96 pocillos profundos con una concentración de 2 mg/mL. Se transfirieron 150 µL de cada una a una placa de 96 pocillos. La caracterización inicial se realizó mediante mediciones de la absorción, dispersión de luz dinámica (DLS), fluorometría de barrido diferencial (DSF) y tinción de partículas. Las muestras se acidificaron usando 1,8 µL de citrato 1 M pH 2,3. Las muestras se neutralizaron después de 2,5 horas utilizando Tris 1 M pH 9,0.

#### Ejemplo 9.2.5 (a) Fluorometría de barrido diferencial de IgG1 purificada

35 Con el fin de evaluar la estabilidad térmica antes y después de la exposición al ácido de IgG1s que representaban cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas para la prueba adicional, se realizó una fluorometría de barrido diferencial (DSF) como se ha descrito en el Ejemplo 9.1.2. Los valores mostrados para cada IgG representan los eventos de falta de plegamiento que tienen lugar dentro de las regiones variables de la IgG. Los valores que representan la falta de plegamiento de la porción Fc no se muestran, ya que generalmente son idénticos para cada IgG. Si los valores de la Tm (punto de fusión aparente) antes y después de la exposición al ácido son iguales, entonces la estructura molecular del anticuerpo no estaba afectada por el ácido o era capaz de volver a plegarse de manera eficaz después de la exposición. Los resultados se muestran en las Figuras 19, 21 y 23.

#### Ejemplo 9.2.5 (b) Absorción UV/vis de IgG1 purificada

45 Con el fin de identificar las muestras que se agregan, se registró la turbidez a 320 nm. La turbidez de las soluciones de IgG se evaluó antes y después de exponer a ácido soluciones de IgG que representaban cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas para una prueba adicional. Los resultados se muestran en las Figuras 19, 21 y 23. La absorción basal era de 0,035 unidades de extinción esperadas para soluciones transparentes. Un aumento de la absorción es debido a la dispersión de luz que da como resultado un aumento de la absorción. Los valores superiores a 0,039 tienen probabilidad de contener agregados. Los valores superiores a 0,045 indican una presencia clara de agregados. Los valores superiores a 0,06 representan niveles de agregación críticos que se encontraron para moléculas con una estabilidad extremadamente desfavorable.

#### Ejemplo 9.2.5 (c) Dispersión de luz dinámica de IgG1 purificada

50 Además, la dispersión de luz dinámica (DLS) se realizó en cada IgG1 que representaba las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas. La dispersión de luz dinámica (DLS) es un método espectroscópico para evaluar el radio hidrodinámico de partículas en solución. Todos los experimentos de DLS se realizaron con un sistema de cubeta DynaPro Titan (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Alemania).

En caso de una contaminación visible de las partículas después de la prueba de estrés, las IgGs se centrifugaron con el fin de eliminar los agregados grandes. Las Figuras 20, 22 y 24 muestran el radio de partícula aparente y la polidispersidad correspondiente a la IgG1 monomérica encontrada en las preparaciones antes y después del tratamiento con ácido. Los datos se evaluaron de acuerdo con el radio calculado del análisis acumulativo. Además del radio hidrodinámico, se evaluó el % de polidispersidad de las preparaciones. Un aumento de la polidispersidad (>15%) indica una agregación potencial de las moléculas de IgG, lo que conduce a una distribución heterogénea del tamaño de partícula. Las partículas con un peso molecular alto (HMW) claramente distinguible de la IgG (radio > 3 veces) no se indican en la tabla. Todos los resultados de DLS se muestran en las Figuras 20, 22 y 24.

#### Ejemplo 9.2.5 (d) Tinción de partículas de IgG1 purificada

Con el fin de evaluar la cantidad y la morfología de los agregados visibles, la tinción de partículas se llevó a cabo antes y después de la exposición a ácido en cada IgG1 que representaban las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas. Se emplearon los siguientes reactivos para filtrar y teñir las partículas en las preparaciones de IgG: filtro estéril Ultrafree-CL de 0,22 µm (Millipore, #UFC40GV0S); conjugado de AP y cadena ligera lambda anti-humano, (Sigma #A-2904); agente de revelado para los conjugados de AP, Fast BCIP/NBT, (Sigma #B-5655); Roti®-ImmunoBlock (Roth #T144.1); solución de detención de la fosfatasa alcalina (Sigma #A5852-100ML); TBS: Tris 0,05 M; NaCl 0,15 M; TBS con 0,1% de Tween 20; y NaCl 5 M.

La solución de proteína se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y los agregados de anticuerpo restantes se tiñeron posteriormente usando el anticuerpo anti Fab2 humano conjugado con fosfatasa alcalina y un agente de revelado de la transferencia Western. El ensayo se realizó de acuerdo con el manual del fabricante. Las muestras se clasificaron posteriormente mediante inspección visual en el rango de 1-4, con categoría 1 que representaba un contenido muy bajo en partículas y la categoría 4 que representaba una carga elevada de partículas de la preparación. Todos los resultados de la tinción de partícula se muestran en las Figuras 20, 22 y 24.

#### Ejemplo 9.2.6 Prueba de estrés de IgG1 purificada con agitación

La capacidad de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para resistir las fuerzas de cizallamiento es un criterio útil ya que las etapas de filtración no se pueden evitar durante el procesamiento. Por lo tanto, las 95 parejas de proteínas de la línea germinal se sometieron a ensayo en formato IgG1 usando una perla de vidrio que se aceleró en una placa de 96 pocillos sobre un agitador orbital a 550 rpm en una placa de pocillos profundos. Se sometieron a este tratamiento 350 µL de cada IgG. De cada una se transfirieron 150 µL a una placa de 96 pocillos. La caracterización inicial se realizó mediante mediciones de la absorción, dispersión de luz dinámica (DLS), fluorometría de barrido diferencial (DSF) y tinción de partículas.

#### Ejemplo 9.2.6 (a) Absorción UV/VIS de IgG1 purificada

Con el fin de identificar las muestras que se agregan, se registró la turbidez a 320 nm. La turbidez de las soluciones de IgG que representaban cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas para una prueba adicional, se evaluó antes y después de la exposición al estrés. Los resultados se muestran en las Figuras 49, 51 y 53. La absorción basal era de 0,035 unidades de extinción esperada para soluciones transparentes. Un aumento de la absorción es debido a la dispersión de luz que da como resultado un aumento de la absorción. Los valores superiores a 0,039 tienen probabilidad de contener agregados. Los valores superiores a 0,045 indican una presencia clara de agregados. Los valores superiores a 0,06 representan niveles de agregación críticos que se encontraron para moléculas con una estabilidad extremadamente desfavorable.

#### Ejemplo 9.2.6 (b) Fluorometría de barrido diferencial de IgG1 purificada

Con el fin de evaluar la estabilidad térmica antes y después de la exposición al ácido de IgG1s que representaban cada una de las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas para la prueba adicional, se realizó la fluorometría de barrido diferencial (DSF) como se ha descrito en el Ejemplo 9.1.2. Los valores mostrados para cada IgG representan los eventos de falta de plegamiento que tienen lugar dentro de las regiones variables de la IgG. Los valores que representaban la falta de plegamiento de la porción Fc no se muestran, ya que generalmente son idénticos para cada IgG1 humana. Los resultados se muestran en las Figuras 50, 52 y 54.

#### Ejemplo 9.2.6 (c) Dispersión de luz dinámica de IgG1 purificada

Además, la dispersión de luz dinámica (DLS) se realizó en cada IgG1 que representaban las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas. La dispersión de luz dinámica (DLS) es un método espectroscópico para evaluar el radio hidrodinámico de partículas en solución. Todos los experimentos de DLS se realizaron con un sistema de cubeta DynaPro Titan (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Alemania).

En caso de una contaminación visible de las partículas después de la prueba de estrés, las IgGs se centrifugaron con el fin de eliminar los agregados grandes. Las Figuras 50, 52 y 54 muestran el radio de partícula aparente y la polidispersidad correspondiente a la IgG1 monomérica encontrada en las preparaciones después del tratamiento con estrés. Los datos se evaluaron de acuerdo con el radio calculado del análisis acumulativo. Además del radio hidrodinámico, se evaluó el % de polidispersidad de las preparaciones. Un aumento de la polidispersidad (>15%) indica

una agregación potencial de las moléculas de IgG, lo que conduce a una distribución heterogénea del tamaño de partícula. Las partículas con un peso molecular alto (HMW) claramente distinguible de la IgG (radio > 3 veces) no se indican en la tabla. Todos los resultados de DLS se muestran en las Figuras 50, 52 y 54.

#### Ejemplo 9.2.6 (d) Tinción de partículas de IgG1 purificada

Con el fin de evaluar la cantidad y la morfología de los agregados visibles, la tinción de partículas se llevó a cabo antes y después de la exposición a estrés en cada IgG1 que representaban las 95 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas. Se emplearon los siguientes reactivos para filtrar y teñir las partículas en las preparaciones de IgG: filtro estéril Ultrafree-CL de 0,22 µm (Millipore, #UFC40GV0S); conjugado de AP y cadena ligera lambda anti-humano (Sigma #A-2904); agente de revelado para conjugados de AP, Fast BCIP/NBT, (Sigma #B-5655); Roti®-ImmunoBlock (Roth #T144.1); solución de detención de la fosfatasa alcalina (Sigma #A5852-100ML); TBS: Tris 0,05 M; NaCl 0,15 M; TBS con 0,1% de Tween 20; y NaCl 5 M.

La solución de proteína se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y los agregados de anticuerpo restantes se tiñeron posteriormente usando el anticuerpo anti Fab2 humano conjugado con fosfatasa alcalina y un agente de revelado de la transferencia Western. El ensayo se realizó de acuerdo con el manual del fabricante. Las muestras se clasificaron posteriormente mediante inspección visual en el rango de 1-4, con la categoría 1 que representaba un contenido muy bajo en partículas y la categoría 4 que representaba una carga elevada de partículas de la preparación. Todos los resultados de la tinción de partícula se muestran en las Figuras 50, 52 y 54.

#### Ejemplo 9.2.7 Puntuación acumulada de las pruebas de estrés de IgG

Con el fin de ayudar a evaluar los resultados de las pruebas de estrés, tanto de la exposición al ácido como de la agitación con perlas de vidrio, se creó un sistema de puntuación para que las parejas de proteínas de la línea germinal se pudieran comparar. A cada punto correspondiente a un dato tomado en los Ejemplos 9.2.5 (a-d), resultados mostrados en las Figuras 19-24 y los Ejemplos 9.2.6 (a-d), resultados mostrados en las Figuras 49-54, se le otorgó una puntuación que variaba de 0-100 (0, 25, 75 o 100) y las puntuaciones se sumaron para generar una puntuación acumulada. Los valores de la estabilidad térmica identificados en los Ejemplos 9.2.5 (a) y 9.2.6 (b) eran puntuaciones no otorgadas.

Las Figuras 55 y 56 muestran las puntuaciones de las pruebas de estrés para las parejas de proteínas de la línea germinal 1-32 de los ejemplos 9.2.5-9.2.6. Cada puntuación es una representación de los puntos de datos sin procesar mostrados en las Figuras 19, 20, 49 y 50. Las Figuras 19-20 muestran la respuesta a la exposición al ácido y las Figuras 49-50 muestran la respuesta a la agitación con perlas de vidrio. La Figura 56 muestra la puntuación acumulada, que es la adición de cada una de las puntuaciones mostradas en las Figuras 55 y 56.

Las Figuras 57 y 58 muestran las puntuaciones de las pruebas de estrés para las parejas de proteínas de la línea germinal 33-64 de los ejemplos 9.2.5-9.2.6. Cada puntuación es una representación de los puntos de datos sin procesar mostrados en las Figuras 21, 22, 51 y 52. Las Figuras 21-22 muestran la respuesta a la exposición al ácido y las Figuras 51-52 muestran la respuesta a la agitación con perlas de vidrio. La Figura 58 muestra la puntuación acumulada, que es la adición de cada una de las puntuaciones mostradas en las Figuras 57 y 58.

Las Figuras 59 y 60 muestran las puntuaciones de las pruebas de estrés para las parejas de proteínas de la línea germinal 65-95 de los ejemplos 9.2.5-9.2.6. Cada puntuación es una representación de los puntos de datos sin procesar mostrados en las Figuras 23, 24, 53 y 54. Las Figuras 23-24 muestran la respuesta a la exposición al ácido y las Figuras 53-54 muestran la respuesta a la agitación con perlas de vidrio. La Figura 60 muestra la puntuación acumulada, que es la adición de cada una de las puntuaciones mostradas en las Figuras 59 y 60.

#### Ejemplo 10: Selección de la composición una colección

En resumen, se seleccionaron 400 parejas de proteínas de la línea germinal, como se ha descrito en el Ejemplo 4. Estas 400 son una representación de la diversidad de parejas de proteínas de la línea germinal que existen en el repertorio inmune humano. Las 400 parejas de proteínas de la línea germinal se sometieron a ensayo como se ha descrito en los Ejemplos 6-7. De las 400, 95 se sometieron a ensayo adicionalmente como se ha descrito en el Ejemplo 9.

Las 95 parejas de proteínas 95 de la línea germinal se compararon teniendo en consideración los siguientes factores: a) tasa de presentación de Fab; b) rendimiento de la expresión de Fab; c) estabilidad térmica de Fab; d) estabilidad en suero de Fab; e) contenido monomérico (% de monómero) de Fab mediante SEC; f) rendimiento de la expresión de IgG1; g) estabilidad térmica de IgG1; h) estabilidad en suero de IgG1; i) contenido monomérico (% de monómero) de IgG1 mediante SEC; y j) punto isoeléctrico (pI) de IgG1. Los datos para cada uno de estos factores se muestran en las Figuras 16-18. Estos factores se correlacionan bien con la capacidad de desarrollo de los anticuerpos terapéuticos.

La tasa de presentación de Fab es un factor importante en la selección de anticuerpos o de fragmentos contra un antígeno. Los Fabs que se presentan con una tasa elevada tienen una mayor probabilidad de estar expuestos al antígeno durante una selección. Una tasa de presentación elevada de cada uno de los diversos Fab asegura que

toda la diversidad de la colección está expuesta a un antígeno durante la selección. La tasa de presentación de Fab se identificó en el Ejemplo 6.2, en donde la referencia era un patrón interno (preparación del fago de referencia HuCAL GOLD (VH3 kappa + lambda)). La preparación de HuCAL GOLD VH3 es una preparación con una presentación elevada. La tasa de presentación de Fab es un factor importante y era útil en la reducción de las 400 parejas a 95 para la prueba adicional, pero en algunas realizaciones no se consideró un factor determinante en la selección de parejas de proteínas de la línea germinal para su incorporación en colecciones.

El rendimiento de la expresión de Fab e IgG1 es importante ya que los anticuerpos o los fragmentos seleccionados contra un antígeno, primero se deben someter a ensayo, frecuentemente *in vitro* o *in vivo* para determinar la actividad funcional, a continuación, en las especies tox y finalmente en los seres humanos para los ensayos clínicos. Es muy importante que los anticuerpos o los fragmentos seleccionados contra un antígeno se puedan expresar de forma eficaz en cantidad suficientemente alta como para soportar todas las diversas pruebas requeridas para el desarrollo terapéutico y para el suministro del ensayo clínico y la comercialización. El rendimiento de la expresión (mg de Fab purificado/L de cultivo de expresión) de los Fab purificados se identificó en el Ejemplo 9.1.1 (resultados mostrados en las Figuras 16-18) y, en una realización de la descripción, se seleccionó un umbral de al menos 2,5 mg/L. En otras realizaciones, se seleccionaron otros umbrales. El rendimiento de la expresión (mg de IgG1 purificada/L de cultivo celular) de IgG1 purificada se identificó en el Ejemplo 9.2.1 (resultados mostrados en las Figuras 16-18) y, en una realización de la descripción, se seleccionó un umbral de al menos 30,0 mg/L. En otras realizaciones, se seleccionaron otros umbrales.

La estabilidad térmica es un factor importante ya que proteínas, tales como, los anticuerpos, son sensibles a altas temperaturas, por lo tanto, es esencial disponer de anticuerpos capaces de soportar los requisitos asociados con el almacenamiento y el transporte, con el fin de distribuir agentes terapéuticos en todo el mundo y que tengan una vida útil larga. La estabilidad térmica de Fab purificado se determinó en el Ejemplo 9.1.2 (resultados mostrados en las Figuras 16-18) y, en una realización de la descripción, se seleccionó un umbral de al menos 70°C. En otras realizaciones, se seleccionaron otros umbrales. Se determinó la estabilidad térmica de IgG1 purificada en el Ejemplo 9.2.2 (resultados mostrados en las Figuras 16-18), el valor indicado representa la desestabilización de los dominios variables y, en una realización, se seleccionó un umbral de al menos 73°C. En otras realizaciones, se seleccionaron otros umbrales.

La estabilidad en suero es un factor importante para anticuerpos terapéuticos ya que las proteínas terapéuticas deben conservar la eficacia y la conformación funcional a pesar de estar expuestas a las proteasas del suero presentes en el suero humano. La estabilidad en suero de las parejas de proteínas de la línea germinal se determinó por los métodos descritos en los Ejemplos 6.5, y 7.2. La estabilidad en suero es importante, pero no se consideró un factor determinante en la selección de parejas de proteínas de la línea germinal ya que el ensayo tendía a producir resultados falsos negativos en algunos casos.

El contenido monomérico (% de monómero) determinado por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un factor importante, ya que se correlaciona bien con la propensión a la agregación. La agregación es un problema común en el desarrollo de proteínas terapéuticas, que conduce a una inactivación, falta de homogeneidad y pérdida de producción de la proteína terapéutica. El contenido monomérico (% de monómero) determinado por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se determinó en ambos formatos Fab purificado e IgG1 purificada, por los métodos descritos en los Ejemplos 9.1.3 y 9.2.3 (resultados mostrados en las Figuras 16-18). El contenido monomérico (% de monómero) de Fab purificado se determinó en el Ejemplo 9.1.3 y, en una realización, se seleccionó un umbral de al menos 98%. En otras realizaciones, se seleccionaron otros umbrales. El contenido monomérico (% de monómero) de IgG1 purificada se determinó en el Ejemplo 9.2.3 y, en una realización, se seleccionó un umbral de al menos 99%. En otras realizaciones, se seleccionaron otros umbrales.

El punto isoeléctrico (pI) predice la solubilidad a un cierto pH. Cuando el pH de la solución es significativamente diferente del pI de una proteína dada, la proteína es soluble. El punto isoeléctrico es importante, pero en algunas realizaciones no se consideró que fuera un factor determinante en la selección de parejas de proteínas de la línea germinal.

En una realización de la presente descripción, se seleccionaron los umbrales para cada criterio de la siguiente manera: a) rendimiento de la expresión de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 98%; y f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99%. Las siguientes parejas de proteínas de la línea germinal (54) se identificaron por tener esas actividades funcionales superiores relacionadas con la capacidad de desarrollo, ya que cada una de las siguientes parejas tenía valores iguales o mejores que estos umbrales (datos mostrados en las Figuras 16-24): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07

(SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1 -05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1 -47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1 -51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1 -27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1 -27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1 -39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1 -51 (SEQ ID NO: 252). Por lo tanto, las colecciones que comprenden cualquier número de estas parejas de proteínas de la línea germinal se pueden utilizar para identificar anticuerpos con capacidad de desarrollo o fragmentos de los mismos contra cualquier antígeno.

Además, un subconjunto de parejas de proteínas de la línea germinal se seleccionaron basándose en una comparación de los datos de las pruebas de estrés identificados, utilizando los métodos descritos en los Ejemplos 9.2.5 (a-d), los datos mostrados en las Figuras 19-24, el Ejemplo 9.2.6 (a-d), datos mostrados en las figuras 49-54 y en el Ejemplo 9.2.7, la puntuación mostrada en las Figuras 55-60. Los métodos de la prueba de estrés evaluaban las 95 parejas de proteínas de la línea germinal en formato IgG1 con el fin de determinar su capacidad para soportar la exposición al ácido y a la agitación con perlas de vidrio. Se seleccionaron 36 parejas de proteínas de la línea germinal, de una realización, ya que tenían propiedades funcionales superiores adicionales, pertinentes para la capacidad de desarrollo, ya que mostraron una fuerte resistencia al estrés por ácido y agitación. La capacidad de un anticuerpo para soportar la exposición al ácido es un factor cada vez más importante, ya que una etapa de inactivación de virus es estándar durante el procesamiento posterior (DSP) de Química, Fabricación y Control (CMC). La etapa de tratamiento con ácido desnaturaliza las proteínas de la cápsida de los virus, que un virus usaría para la infección. Sin embargo, la disminución del pH tiene un efecto desestabilizador sobre cada proteína. Los anticuerpos inestables se desnaturalizan y pierden la estructura natural durante esta etapa. En la etapa de activación de virus, después de un tiempo definido, el tratamiento con ácido se compensa con la neutralización y, ya que las proteínas de la cápsida del virus se conservan en una conformación inactiva, el anticuerpo procesado retiene idealmente su estructura natural. La capacidad de los anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos para resistir las fuerzas de cizallamiento es un criterio útil, ya que las etapas de filtración no se pueden evitar durante el procesamiento. Estas 36 parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas en una realización, cumplían todas las actividades funcionales umbrales anteriores y, además, obtuvieron puntuaciones iguales o superiores a 1225 en la puntuación acumulada de la prueba de estrés. En una realización, se seleccionaron los umbrales para cada criterio de la siguiente manera: a) rendimiento de la expresión de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 98%; f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99% y g) puntuación acumulada de las pruebas de estrés (como se describe en el Ejemplo 9.2.7) de al menos 1225. Por lo tanto, las realizaciones de la presente descripción comprenden colecciones que comprenden un subconjunto de las parejas de proteínas de la línea germinal totalmente funcionales (36 de las 54) y que tienen propiedades funcionales superiores adicionales, pertinentes para la capacidad de desarrollo. En esta realización, una colección comprende VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO:

211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En otra realización, se seleccionaron los umbrales para cada criterio de la siguiente manera: a) rendimiento de la expresión de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.1) de al menos 2,5 mg/L; b) rendimiento de la expresión de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.1) de al menos 30,0 mg/L; c) estabilidad térmica de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.2) de al menos 70°C; d) estabilidad térmica de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.2) de al menos 73°C; e) contenido monomérico de Fab purificado (como se describe en el Ejemplo 9.1.3) de al menos 99%; f) contenido monomérico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.3) de al menos 99%; g) punto isoeléctrico de IgG1 purificada (como se describe en el Ejemplo 9.2.4) de al menos 8,3; y h) puntuación acumulada de las pruebas de estrés (como se describe en el Ejemplo 9.2.7) de al menos 1225. En esta realización, una colección comprende (33 parejas): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

En una realización adicional, se añadieron parejas a una colección a pesar de que las parejas mismas no cumplían todos los umbrales de cada criterio, pero se añadieron a las colecciones con el fin de aumentar la diversidad. En una realización, una colección comprende adicionalmente: VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); y VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256). En esta realización, una colección comprende (36 parejas): VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

#### Ejemplo 11: Prueba beta de las colecciones

Con el fin de confirmar la eficacia del diseño de las colecciones, se generaron subcolecciones, en donde cada una comprendía una pareja de proteínas de la línea germinal o agrupaciones de subcolecciones y se seleccionaron frente a los antígenos. Los anticuerpos seleccionados se sometieron a ensayo después en ambos formatos Fab e IgG1 para estudiar las características de la capacidad de desarrollo, tales como, estabilidad térmica en formato Fab, pI en formato IgG1, rendimientos de la expresión en ambos formatos Fab e IgG1, estabilidad térmica en formato IgG1 y % de monómero en formato IgG1 determinado por SEC. Además, en algunos casos, se determinó la afinidad hacia el

antígeno en formato Fab.

#### Generación de colecciones

Las subcolecciones que contenían parejas de proteínas de la línea germinal se sintetizaron del modo siguiente: las regiones FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 de las respectivas secuencias de proteínas de la línea germinal que se muestran en las Figuras 25-33, se sintetizaron mediante GeneArt (Regensburg, Alemania). Las VHs se clonaron a través de NheI y SalI y las VLs a través de NdeI y Acc65I en el vector de presentación pJPd1. Las casetes CDR-H3, incluyendo la región constante FR4, se insertaron a través de BssHII y XhoI con diversidades teóricas que oscilaban entre  $5,5 \times 10^5$  y  $1,9 \times 10^{19}$ . Las casetes CDR-H3 con longitudes de CDR-H3 de 6-17 aminoácidos, se sintetizaron mediante Sloning (Martinsried, Alemania). La diversidad de CDR-L3 se logró mediante la introducción de casetes TRIM de Kappa o lambda sintetizados por ELLA Biotech (Martinsried, Alemania) con una diversidad teórica que oscilaba entre  $4,6 \times 10^6$  y  $2,5 \times 10^9$ .

Típicamente 0,25 a 2 µg de ADN de fagémido pJPd1 de las subcolecciones, se transformaron en células electrocompetentes de E. coli MC1061 F' y los transformantes se recogieron en medio TB y se agitaron durante 1 h a 37°C. Las diluciones del medio de crecimiento se extendieron en placas de LB/Cam/Glc. La amplificación de las genotecas se llevó a cabo mediante agitación durante una noche en cantidades apropiadas de LB/CAM/1% de Glu. Los tamaños de las genotecas para las subcolecciones oscilaban entre  $4,6 \times 10^8$  y  $4,4 \times 10^9$ . El tamaño total de la genoteca de todas las subcolecciones juntas es de aproximadamente  $1,3 \times 10^{11}$  miembros. Para analizar la calidad de las subcolecciones modificadas genéticamente, se recogieron al menos 30 clones para cada subcolección y las regiones CDR-L3 y -H3 se secuenciaron para determinar la corrección y la singularidad de las secuencias. Las genotecas se almacenaron como cultivos de E. coli en glicerol.

Los fagos que presentaban las subcolecciones en formato Fab se prepararon del modo siguiente. Para cada preparación de fago de la genoteca, se inocularon 80 ml de 2x medio YT/Cam/Glc con bacterias de la solución madre en glicerol de la genoteca correspondiente dando lugar a una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,2 - 0,3. Los cultivos se agitaron hasta que se alcanzó una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,45 a 0,55. Entonces se añadió al cultivo bacteriano el fago auxiliar con una multiplicidad de infección de 10, seguido por una incubación durante 45 min a 37°C sin agitación y luego durante 45 min a 37°C con agitación a 120 rpm. Las bacterias se centrifugaron y se retiró el material sobrenadante que contenía el fago auxiliar. Las bacterias infectadas por fagos se resuspendieron en 400 ml de 2x medio YT/CAM/KAN/IPTG y se incubaron durante una noche a 22°C con agitación a 120 rpm. Al día siguiente, las bacterias del cultivo de una noche se sedimentaron y se recogió el material sobrenadante que contenía el fago que presentaba Fab. La precipitación de los fagos se realizó mediante la adición de PEG/NaCl al material sobrenadante que contenía los fagos. La muestra se incubó durante al menos 30 min en hielo. Los fagos precipitados se centrifugaron y se resuspendieron en PBS. La muestra se hizo girar lentamente para obtener una suspensión homogénea y los restos bacterianos residuales se sedimentaron y se desecharon. A partir del material sobrenadante que contenía el fago, los fagos precipitaron de nuevo utilizando PEG/NaCl. Por último, el sedimento de fago se resuspendió en PBS, se transfirió a un tubo estéril y se agitó lentamente para obtener una suspensión homogénea. Los títulos de fago se determinaron mediante titulación puntual, ELISA y absorbancia de UV (Nanodrop) a una  $DO_{268\text{ nm}}$ .

Los títulos de fagos y los niveles de presentación de fragmentos Fab expresados por el vector de presentación tricistónico pJPd1 (mostrado en la Figura 9) y presentados en el fago mediante CysDisplay® (como se describe en el documento WO01/05950, US 6.753.136, que se incorpora como referencia en su totalidad) se evaluaron para cada preparación de fago individual mediante ELISA

Se emplearon dos anticuerpos diferentes para la captura:

(1) Se utilizó el anticuerpo anti-M13 (Amersham #27-9420-01), ya que captura partículas de fago a través de la proteína de recubrimiento principal g8p; por lo tanto, el título del fago se puede determinar.

(2) Un anticuerpo anti-Fd (The Binding Site #PC075), que se une al Fab presentado; por lo tanto, solo se capturan los Fab presentados en fagos.

Para (1) y (2) se utilizan curvas de referencia distintas. Un anticuerpo monoclonal anti-M13 (dirigido contra la proteína de recubrimiento principal del fago M13, g8p) conjugado con HRP se utiliza como un anticuerpo de detección.

Los anticuerpos de captura respectivos se inmovilizaron sobre placas Maxisorp™ de 96 pocillos añadiendo solución de anticuerpo para el anticuerpo anti-M13 y para el anticuerpo anti-Fd en distintos pocillos, sellando la placa con papel de aluminio laminado e incubando durante una noche. Al día siguiente, las placas se lavaron con TBST y cada pocillo se bloqueó con CTBST.

Las diluciones del material sobrenadante de fagos y las muestras de referencia (CS) se prepararon en CTBST en placas de microtitulación. Se prepararon las diluciones de partida del material sobrenadante de fagos para los anticuerpos anti-M13 y anti-Fd. Las diluciones de partida de las muestras de referencia, VH3-23 HuCAL Gold® I+k VCSM13 e hiperfagos kappa y lambda agrupados HuCAL PLATINUM se prepararon. Las diluciones en serie del material sobrenadante de los fagos se prepararon llenando previamente placas de microtitulación con CTBST y

añadiendo el fago y llenando previamente una segunda placa de microtitulación con CTBST, y añadiendo el fago. Para la muestra de referencia, la dilución de partida descrita anteriormente se extendió en placas y diluciones en serie con los anticuerpos anti-M13 y anti-Fd se extendieron en placas.

Tanto el material sobrenadante de los fagos como las muestras de referencia se transfirieron para la detección de la siguiente manera. Las placas de ELISA bloqueadas se lavaron con TBST. El material sobrenadante de los fagos se transfirió desde las placas de dilución a las placas de ELISA recubiertas, se incubaron a temperatura ambiente, y se lavaron con TBST. Se añadió anti-M13 conjugado con peroxidasa (Amersham) diluido en CTBST, y se incubó durante 1-2 h a temperatura ambiente. Se preparó la solución de trabajo Quanta Blu (Pierce) mezclando 1 parte (por ejemplo, 0,5 ml) de solución de peróxido con 9 partes (por ejemplo, 4,5 ml) de solución de sustrato. Las placas de ELISA se lavaron con TBST, se añadió la solución de trabajo QuantaBlu. La fluorescencia se midió después de un tiempo de incubación de ~2 min (excitación: 320 nm, emisión: 430 nm) y, posteriormente, a intervalos de 5 min. La evaluación de los datos de ELISA se completó del modo siguiente: se crearon curvas de calibración y se calcularon los títulos del material sobrenadante de los fagos y de control. Para cada muestra, el título de anti-Fd se dividió por el título de anti-M13 (anti-pVIII), la relación resultante era la tasa de presentación relativa. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Subgenoteca	Región estructural		Titulación (Titulación puntual)		Titulación (ELISA)		Presentación relativa	
	VH	VL	prep. fago I	prep. fago II	prep. fago I	prep. fago II	prep. fago I	prep. fago II
<b>18</b>	VH3-23	VK1-39	5,7e+12	2,9E+12	2,9E+13	8,0E+12	<b>6,1</b>	<b>9,3</b>
<b>119</b>	VH3-23	VL3-1	6,6E+12	2,2E+12	2,8E+13	9,2E+12	<b>6,6</b>	<b>8,8</b>

Selección de la presentación en fagos contra DKK3 humana, la fusión rhErbB4/Her4 Fc, la fusión rhFZD-4 Fc y eGFP

Se llevaron a cabo estrategias de selección paralelas con subcolecciones o agrupaciones de subcolecciones individuales con el fin de maximizar la posibilidad de identificar diversos anticuerpos de unión con las características biofísicas deseadas. Dickkopf-3 (DKK3) (Gen ID 27122), proteína de fusión recombinante humana (rh)ErbB4/Her4 (Gen ID 2066)\_Fc, fusión rhFZD-4 (Gen ID 8322) Fc y eGFP (proteína fluorescente verde mejorada; secuencia proporcionada más arriba) se eligieron como antígenos modelo para la validación de la colección. El escrutinio de las colecciones se realizó en una solución basada en perlas epoxi M-450 separando con los antígenos respectivos, acoplados covalentemente a perlas Dynabeads (R) magnéticas (Dyna/Invitrogen nº de Prod. 140.11), descritas a continuación.

Solución de selección basada en perlas contra DKK3

Las perlas de carboxilo recubiertas con DKK3 y BSA de control (Dyna) se bloquearon con MPBST a temperatura ambiente (TA) antes de la incubación con fagos adsorbidos previamente. Después de varias etapas de lavado, los fagos unidos se eluyeron y se amplificaron infectando células TG1F+ para la siguiente ronda de selección. Después de 3 rondas de selección, el ADN del fagémido pJPd1 (que se muestra en la Figura 9) se aisló y los fragmentos que codificaban Fab (ompA-VL modificado y phoA-Fd modificado) se escindieron mediante digestión con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI y se ligaron en el vector de expresión pJPx1 (mostrado en la Figura 10) y se transformaron en E. coli TG1 F-. Los cultivos infectados se sembraron en placas grandes de LB/Cam/Gluc y se cultivaron durante una noche. Los clones individuales se aislaron y sometieron a ensayo para estudiar el rendimiento de la expresión de Fab y la unión del antígeno mediante ELISA. La expresión de Fab se detectó mediante la incubación de extractos celulares que contenían Fab sobre una placa de ELISA recubierta con anti-Fd humano de oveja (The Binding Site, Cat. PC075) seguido por la detección con anticuerpo de cabra anti-IgG humana específico del fragmento F(ab') conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Cat. 109-055-097). La especificidad del antígeno se sometió a ensayo mediante el escrutinio de extractos celulares que contenían Fab sobre perlas de carboxilo acopladas a DKK3 y perlas de carboxilo acopladas a BSA (Dyna) con una tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT®) para los ensayos basados en perlas (Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System / PE Biosystems). Los aciertos primarios se definieron como los Fabs que daban lugar a una señal de fluorescencia media FMAT, al menos 5 veces mayor que el ruido de fondo que se estableció en un valor de 200. La especificidad de DKK3 se confirmó en un ELISA secundario con DKK3 como antígeno análogo y CD38\_Fc como antígeno de control negativo. La región CDR3 de la cadena pesada y ligera de 63, 43 y 44 clones para las subgenotecas VH3-23/VK1-39, VH3-23/VL3-1 y HuCAL Platinum® VH3-23/kappa se seleccionaron para la secuenciación con el fin de estimar la diversidad de secuencias de anticuerpos que se unen a DKK3. Las secuencias de las CDR-H3 y CDR-L3 de ligantes seleccionados se muestran en las Figuras 86. En total, 31 de 56 secuencias con éxito (55%), 20 de 35 secuencias (47%) y 17 de 44 secuencias (39%) para las subgenotecas VH3-23/VK1-39, VH3-23/VL3-1 y HuCAL-Pt VH3-23/kappa, respectivamente eran diferentes, mostrando que las genotecas construidas contenían un repertorio diverso de ligantes de



DKK3. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14

<b>Dkk-3</b>					
genoteca	escrutado	Aciertos	tasa de aciertos [%]	seleccionado para Sec.	único / secuencias
<b>I8</b>	<b>732</b>	<b>525</b>	<b>72</b>	<b>63</b>	<b>31 / 56</b>
<b>I19</b>	<b>715</b>	<b>536</b>	<b>75</b>	<b>43</b>	<b>20 / 35</b>
<b>HuCAL-Pt VH3-23/k</b>	<b>736</b>	<b>667</b>	<b>91</b>	<b>44</b>	<b>17 / 44</b>

I8 representa VH3-23/VK1-39, e I19 representa VH3-23/VL3-1.

#### 5 Selección en solución basada en perlas contra la fusión rhErbB4/Her4 Fc, la fusión rhFZD-4 Fc y eGFP

La fusión rhErbB4/Her4\_Fc, la fusión rhFZD-4 Fc o eGFP y perlas epoxi M450 (Dynal) con BSA de control se bloquearon con Chemiblocker durante 2 horas a temperatura ambiente (TA) antes de la incubación con fagos preadsorbidos durante 2 horas a TA. Después de varias etapas de lavado, el fago unido se eluyó y se amplificó infectando células TG1F+ para la siguiente ronda de selección. Después de 3 rondas de selección, el ADN del fagémido pJPd1 (que se muestra en la Figura 9) se aisló y los fragmentos que codificaban Fab (ompA-VL modificado y phoA-Fd modificado) se amplificaron por PCR, se purificaron y se digirieron con XbaI y EcoRI y se ligaron en el vector de expresión pJPx1 (que se muestra en la Figura 10) y se transformaron en E. coli TG1 F-. Los cultivos infectados se sembraron en placas grandes de LB/Cam/Gluc y se cultivaron durante una noche. Los clones individuales se aislaron y se sometieron a ensayo para estudiar el rendimiento de la expresión de Fab y la unión del antígeno mediante ELISA. La expresión de Fab se detectó mediante la incubación de extractos celulares que contenían Fab sobre una placa de ELISA recubierta con anti-Fd humano de oveja (The Binding Cat. PC075) seguido por la detección con anticuerpo de cabra anti-IgG humana específico del fragmento F(ab')2 conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Cat. 109-055-097). La especificidad del antígeno se sometió a ensayo mediante el escrutinio con ELISA con extractos celulares que contenían Fab sobre antígeno rhErbB4/Her4\_Fc, antígeno rhFZD-4\_Fc o eGFP recubierto directamente sobre placas MaxiSorp. Los aciertos primarios se definieron como los Fabs que daban lugar a una señal de ELISA al menos 5 veces mayor que el ruido de fondo. Los resultados se muestran en las Figuras 61A-D.

#### Selección con captura de Fc contra ErbB4/Her4 fc

Se realizaron tres rondas de selección en fase sólida con captura de Fc utilizando la proteína ErbB4/Her4 humana recombinante, marcada con Fc inmovilizada, mediante la captura con anticuerpo de cabra anti-IgG humana específico de Fc (Jackson; Cat. 109-005-098) o de ratón anti-IgG humana específico de Fc (Jackson; Cat. 209-005-098) sobre placas Maxisorp (Nunc). Antes de cada ronda de selección, los fagos se bloquearon con 0,1 mg/ml de inmunoglobulina humana, de cabra y de ratón en MPBST/BSA. Después de varias etapas de lavado, se eluyó el fago unido y se amplificó infectando células TG1F+ para la siguiente ronda de selección. Después de la tercera ronda de selección, el ADN del fagémido pJPd1 (que se muestra en la Figura 9) se aisló y los fragmentos que codificaban Fab (ompA-VL modificado y phoA-Fd modificado) se escindieron mediante digestión con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI y se ligaron en el vector de expresión pJPx1 (mostrado en la Figura 10) y se transformaron en TG1F-. Los cultivos infectados se sembraron en placas grandes de LB/Cam/Gluc y se cultivaron durante una noche. Los clones individuales se aislaron y se sometieron a ensayo para estudiar el rendimiento de la expresión de Fab y la unión del antígeno mediante ELISA. La expresión de Fab se detectó mediante la incubación de extractos celulares que contenían Fab sobre una placa de ELISA recubierta con anti-Fd humano de oveja (The Binding Site Cat. PC075) seguido por la detección con anticuerpo de cabra anti-IgG humana específico del fragmento F(ab')2 conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Cat. 109 055 097). La especificidad del antígeno se sometió a ensayo mediante un escrutinio con ELISA con extractos celulares que contenían Fab sobre el antígeno rhErbB4/Her4\_Fc capturado a través de anticuerpo de cabra anti-IgG humana (Jackson; Cat. 109-005-098) recubierto sobre placas MaxiSorp. Los aciertos primarios se definieron como los Fabs que daban lugar a una señal de ELISA al menos 5 veces mayor que el ruido de fondo. La especificidad de ErbB4/Her4\_Fc se confirmó en un ELISA secundario con captura de Fc con ErbB4/Her4\_Fc como antígeno análogo y CD38\_Fc como antígeno de control negativo.

Las regiones CD3 de la cadena pesada y ligera de los 112, 61 y 95 clones para las subgenotecas VH3-23/VK1-39, VH3-23/VL3-1 y HuCAL-Pt VH3-23/kappa, respectivamente, se secuenciaron con el fin de estimar la diversidad de las secuencias de los anticuerpos que se unen a ErbB4/Her4\_Fc. En total, 31 de las 106 secuencias con éxito (29%), 30 de las 61 secuencias (49%) y 14 de las 91 secuencias (15%) para las subgenotecas VH3-23/VK1-39, VH3-23/VL3-1 y HuCAL-PT VH3-23/kappa eran diferentes, mostrando que las genotecas construidas contenían un repertorio diverso de ligantes. La diversidad de la secuencia se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15

Her4_Fc											
genoteca	escrutado	Aciertos			Aciertos*	Tasa de aciertos [%]	seleccionado para CP**				único ***
		10x Bg	5x Bg	2x Bg			10x Bg	5x Bg	2x Bg	total	
I8	794	112	150	92	262	33	86	19	7	112	31 / 106
I19	1145	39	7	15	46	4	39	7	15	61	30 / 61
HuCAL-Pt VH3-23/k	1364	922	105	118	1027	75	95	0	0	95	14 / 91

\* Los aciertos se definen como con una reactividad de al menos 5x la del ruido de fondo (Bg)

\*\* Para las placas de compresión (CP) se seleccionaron unos pocos clones con una reactividad de solamente 2x la del ruido de fondo (Bg)

5 \*\*\* Secuencias únicas por secuencias analizables

I8 representa VH3-23/VK1-39 e I19 representa VH3-23/VL3-1

#### Determinación de la $K_D$ (afinidad) mediante Biacore a través del sistema de captura de antígeno en formato Fab

10 La unión de fracciones Fab monoméricas (analizadas por SEC analítica; Superdex 75, Amersham Pharmacia) al antígeno capturado se analizó del modo siguiente: en un chip CM5 (Biacore/GE Healthcare) un anticuerpo de captura marcado con un anti-antígeno apropiado, se inmovilizó covalentemente usando la química EDC/NHS. Las mediciones cinéticas se realizaron mediante la captura del antígeno y la posterior inyección de seis concentraciones diferentes de Fab ( $2^n$  dilución en serie). Después de cada ciclo, se regeneró el chip sensor. Una inyección en blanco de tampón de ejecución fue utilizada para la referencia doble. Todos los sensogramas se ajustaron utilizando el programa informático de evaluación BIA 3.2 (Biacore/GE Healthcare), para determinar las constantes de la tasa  $k_{on}$  y  $k_{off}$ , que se utilizaron para calcular la  $K_D$ .

15 Las determinaciones de la  $K_D$  mediante Biacore se realizaron del modo siguientes: el tampón de ejecución era PBST (solución salina tamponada con fosfato pH 7,2 GIBCO + 0,05% de Tween-20). Se capturaron aprox. 400 UR de antígeno con marcador de fusión Fc (lote # FYY0310041) usando un anticuerpo anti-Fc humano (Biacore/GE Healthcare). Las concentraciones de Fab que oscilaban desde 15,6 a 500 nM se utilizaron con un caudal de 20  $\mu$ l/min, un tiempo de inyección de 30 s y un tiempo de disociación de 100 s. La regeneración de la superficie se realizó con 2 inyecciones de 15  $\mu$ l cada una de reactivo  $MgCl_2$  3 M. Los resultados se muestran en la Figura 38.

#### Evaluación de la capacidad de desarrollo de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos identificados contra DKK3, la fusión rhErbB4/Her4 Fc, la fusión rhFZD-4 Fc y eGFP

25 Los anticuerpos o fragmentos específicos para los antígenos se sometieron a ensayo en ambos formatos Fab e IgG1 para determinar las características de la capacidad de desarrollo, tales como, la estabilidad térmica en formato Fab, la afinidad en formato Fab, el pl en formato IgG1, el rendimiento de la expresión en ambos formatos Fab e IgG, la estabilidad térmica en formato IgG1 y el % monomérico en formato IgG1 según se determinó por SEC. La estabilidad en suero en formato IgG1 se sometió a ensayo como se describe en el Ejemplo 7.2. El ensayo de estabilidad térmica en los formatos Fab e IgG1 se completó como se describe en los Ejemplos 9.1.2 y 9.2.2. El pl en formato IgG1 se completó como se describe en el Ejemplo 9.2.4. El rendimiento de la expresión en formato IgG1 se completó como se describe en el Ejemplo 9.2.1. El % monomérico en formato IgG1 determinado por SEC se completó como se describe en el Ejemplo 9.2.3. Los resultados se muestran en las Figuras 37-39, 45-48 y 62.

35 Una vez más, los inventores creen que existe una alta correlación entre el aporte (colección de anticuerpos utilizada para la selección contra a un antígeno) y el resultado (anticuerpos identificados como específicos para el antígeno) con respecto a las propiedades funcionales sometidas a ensayo. Por lo tanto, las colecciones de la invención comprenden anticuerpos o fragmentos que comprenden, en parte, las mismas secuencias de aminoácidos que las estructuras artificiales sometidas a ensayo, por ejemplo, las regiones estructurales y/o las regiones determinantes de complementariedad. Las CDR3s están diversificadas. Debido a que, en un aspecto, las colecciones comprenden las secuencias de aminoácidos o los ácidos nucleicos que las codifican, de las estructuras artificiales sometidas a ensayo, se cree que las colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos que tienen las mismas propiedades funcionales superiores relacionadas con la capacidad de desarrollo que las estructuras artificiales sometidas a ensayo en el Ejemplo 9. Por lo tanto, cabe esperar que muchos de los anticuerpos o fragmentos seleccionados posteriormente contra un antígeno, también presenten las mismas propiedades funcionales superiores relevantes para la capacidad de desarrollo.

45 Los datos mostrados en las Figuras 37-39, 45-48 y 62A-C respaldan esta conclusión. La Figura 39 muestra los Fabs

seleccionados contra el antígeno DKK3 o ErbB4/Her4\_Fc procedentes de las colecciones de la invención y cómo los Fabs tienen una estabilidad térmica similar a la del control, que era la estructura artificial sometida a ensayo inicialmente, tal como se describe en el Ejemplo 9. Además, las Figuras 45-48 muestran las IgGs específicas para el antígeno DKK3 o ErbB4/Her4\_Fc que se seleccionaron a partir de las colecciones de la invención y cómo las IgGs tienen puntos isoeléctrico (pI), estabilidad térmica, rendimiento de la expresión y contenido monomérico similares a los de los controles, que eran las estructuras artificiales sometidas a ensayo originalmente como se describe en el Ejemplo 9. Las Figuras 62A-C muestran las IgGs seleccionadas contra la fusión rhErbB4/Her4\_Fc, la fusión rhFZD-4 Fc e eGFP y cómo las IgGs tienen puntos isoeléctrico (pI), rendimiento de la expresión, estabilidad térmica y contenido monomérico similares a los de los controles, que eran las estructuras artificiales sometidas a ensayo originalmente como se describe en el Ejemplo 9

En general, esto muestra que las colecciones de la invención contienen anticuerpos o fragmentos que tienen propiedades superiores relevantes para la capacidad de desarrollo y respalda la hipótesis de los inventores de que el aporte, colecciones que emplean secuencias, por ejemplo, regiones estructurales y/o regiones determinantes de la complementariedad de la parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo y que se ha demostrado que tienen propiedades funcionales superiores, se correlacionan bien con el resultado, anticuerpos o fragmentos seleccionados contra cualquier antígeno que tiene las mismas propiedades funcionales superiores relacionadas con el desarrollo.

Se debe sobreentender que la descripción, los ejemplos y los datos específicos, aunque indican realizaciones ejemplares, se proporcionan a modo de ilustración y no tienen intención de limitar la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, en donde al menos el 50% de los anticuerpos o fragmentos funcionales comprenden parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales de dichas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable consisten en veinticinco o más secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que tienen las secuencias tal y como se definen en las figuras 25-36: VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/NL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).
2. Una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos según la reivindicación 1, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable consisten en treinta o más secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que tienen las secuencias tal y como se definen en las figuras 25-36: VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL3-21 (SEQ ID NO: 257); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-16 (SEQ ID NO: 234); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL2-14 (SEQ ID NO: 254); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-30 (SEQ ID NO: 212)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

3. Una colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que tienen las secuencias tal y como se definen en las figuras 25-36: VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VL3-1 (SEQ ID NO: 256); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

4. Una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos según la reivindicación 3, en donde las regiones estructurales de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable consisten en las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que tienen las secuencias tal y como se definen en las figuras 25-36: VH1-18 (SEQ ID NO: 204)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH1-46 (SEQ ID NO: 205)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH1-69\*01 (SEQ ID NO: 206)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-07 (SEQ ID NO: 207)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-47 (SEQ ID NO: 251); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-11 (SEQ ID NO: 208)/VL2-23 (SEQ ID NO: 255); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK1-27 (SEQ ID NO: 235); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VK3-11 (SEQ ID NO: 237); VH3-15 (SEQ ID NO: 209)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH3-21 (SEQ ID NO: 210)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-23 (SEQ ID NO: 211)/VK3-15 (SEQ ID NO: 238); VH3-53 (SEQ ID NO: 213)/VL2-11 (SEQ ID NO: 253); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-05 (SEQ ID NO: 230); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-06 (SEQ ID NO: 231); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK1-12 (SEQ ID NO: 233); VH3-74 (SEQ ID NO: 214)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VK1-39 (SEQ ID NO: 236); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-40 (SEQ ID NO: 250); VH5-51 (SEQ ID NO: 215)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK1-09 (SEQ ID NO: 232); VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VK3-20 (SEQ ID NO: 239) y VH6-1 (SEQ ID NO: 216)/VL1-51 (SEQ ID NO: 252).

5. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable.

6. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden regiones CDR1 que consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable.

7. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden regiones CDR2 que consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal de las respectivas parejas de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable.

8. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden modificaciones de aminoácidos que eliminan sitios potenciales de modificación postraduccional.

9. La colección según la reivindicación 8, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada que comprenden las secuencias de regiones determinantes de complementariedad procedentes de las respectivas cadenas pesadas

variables representadas en las figuras 34-36.

10. La colección según la reivindicación 9, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden regiones HCDR1 procedentes de la respectiva región HCDR1 representada en la figura 34.
- 5 11. La colección según las reivindicaciones 9 o 10, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden regiones HCDR2 procedentes de la respectiva región HCDR2 representada en la figura 35.
12. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región FR4 seleccionada a partir del grupo que consiste en JH4, Jk1 y Jλ2/3 cuyas secuencias se definen en la figura 40.
- 10 13. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región HCDR3 diversificada.
14. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región LCDR3 diversificada.
15. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la colección comprende al menos  $1 \times 10^4$  anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.
- 15 16. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos anticuerpos se seleccionan a partir de los grupos que consisten en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM e IgD humanas.
17. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos fragmentos funcionales de dichos anticuerpos se seleccionan a partir del grupo que consiste en Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv y scFv.
- 20 18. Una colección de ácidos nucleicos que codifica una colección de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
19. Un vector que comprende la colección de ácidos nucleicos según la reivindicación 18.
20. Una célula hospedadora recombinante que comprende los ácidos nucleicos según la reivindicación 18 o el vector según la reivindicación 19.
- 25 21. Un método para identificar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para un antígeno, que comprende:
  - (a) poner en contacto el antígeno con una colección de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos según la reivindicación 1, y (b) seleccionar uno o varios anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a dicho antígeno.

Figura 1

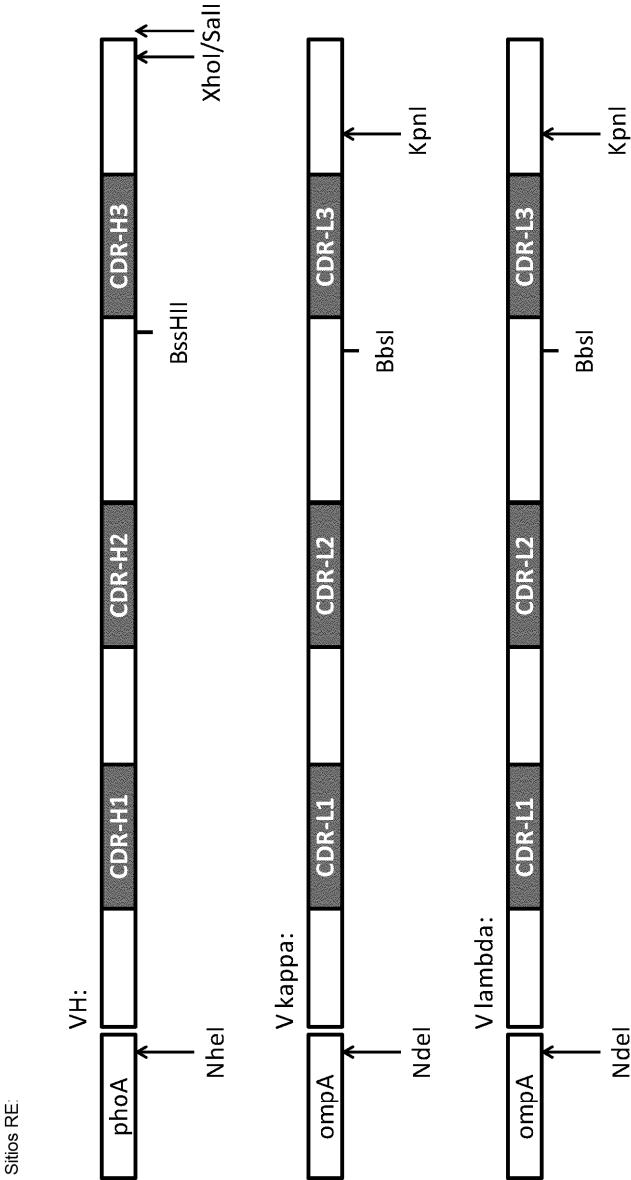


Figura 2

## Resumen de los 20 genes de la región VH

Longitudes de CDRs					Comprobación de Epibase				Aggresolve		
Genes de la cadena pesada de la línea germinal	Kabat CDR-H1	Kabat CDR2-H2	VNTI pl	Pos. de clasificación	PTMs (sin NkS/T)	NxS/T	Met en CDRs	Cisteína (para eliminar)	Desviaciones de la línea germinal	Epitopo de linfocito T fuerte	Propensión teórica a la agregación
1 hVH_1_2	5	17	9.4	14	2	0	1	0	0	0	intermedia
2 hVH_1_18	5	17	9.2	9	2	0	0	0	0	0	alta
3 hVH_1_69	5	17	9.3	7	0	0	0	0	0	0	intermedia
4 hVH_1_46	5	17	9.2	21	0	0	1	0	0	0	n.d.
5 hVH_3_7	5	17	8.6	8	4	0	1	0	0	0	baja
6 hVH_3_11	5	17	9.0	17	2	0	1	0	0	0	n.d.
7 hVH_3_15	5	19	9.0	12	3	0	1	0	0	0	baja
8 hVH_3_21	5	17	9.0	11	3	0	1	0	0	0	intermedia
9 hVH_3_23	5	17	8.7	1	3	0	1	0	0	0	intermedia
10 hVH_3_30	5	17	9.3	2	4	0	1	0	0	0	intermedia
11 hVH_3_33	5	17	9.3	15	4	0	1	0	0	0	n.d.
12 hVH_3_48	5	17	8.0	10	3	0	1	0	0	0	intermedia
13 hVH_3_53	5	16	8.7	16	3	0	1	0	0	0	intermedia
14 hVH_3_73	5	19	9.5	33	3	0	1	0	0	0	n.d.
15 hVH_3_74	5	17	9.1	19	4	0	1	0	0	0	n.d.
16 hVH_4_4	6	16	9.3	20	0	0	0	1	0	0	n.d.
17 hVH_4_31	7	16	9.2	13	0	0	0	0	0	0	n.d.
18 hVH_4_39	7	16	9.0	3	0	0	0	0	0	0	n.d.
19 hVH_5_51	5	17	8.6	6	1	0	0	0	0	0	intermedia
20 hVH_6_1	7	18	9.3	39	3	0	1	0	0	0	n.d.



Figura 3

Resumen de los 20 genes de la región VL

	Genes de la cadena ligera de la línea germinal	Kabat CDR-L1	Kabat CDR-L2	VNTI pl	Pos. de la clasificación	PTMs (sin NkS/T)	NkS/T	Met en CDRs	Cisteína (para eliminar)	Desviaciones de la línea germinal	Epitopo de linfocito T fuerte	Propensión teórica a la agregación
1	hVL_1-40	14	7	4.9	2	1	0	0	0	0	0	intermedia
2	hVL_1-47	13	7	5.0	5	0	0	0	0	0	0	intermedia
3	hVL_1-51	13	7	6.2	4	0	0	0	0	1	0	intermedia
4	hVL_2-11	14	7	6.7	8	0	0	0	0	0	0	n.d.
5	hVL_2-23	14	7	6.7	6	0	0	0	0	0	0	n.d.
6	hVL_2-14	14	7	5.6	1	0	0	0	0	0	0	alta
7	hVL_3-1	11	7	4.5	9	2	0	0	1	2	1*	n.d.
8	hVL_3-21	11	7	4.8	7	2	0	0	0	1	1*	n.d.
9	hVK_1_5	11	7	5.0	3	1	0	0	0	0	0	alta
10	hVK_1_6	11	7	8.0	16	0	0	0	0	0	0	n.d.
11	hVK_1_9	11	7	8.0	9	0	0	0	0	0	0	n.d.
12	hVK_1_12	11	7	8.0	15	0	0	0	0	0	0	n.d.
13	hVK_1_16	11	7	8.0	14	0	0	0	0	0	0	n.d.
14	hVK_1_17	11	7	8.7	11	0	0	0	0	0	0	n.d.
15	hVK_1_27	11	7	8.7	12	0	0	0	0	0	0	n.d.
16	hVK_1_39	11	7	8.0	2	0	0	0	0	0	0	alta
17	hVK_2_30	16	7	8.0	10	2	0	0	0	0	0	n.d.
18	hVK_3_11	11	7	6.3	6	0	0	0	0	0	0	intermedia
19	hVK_3_15	11	7	8.0	4	0	0	0	0	0	0	intermedia
20	hVK_3_20	12	7	6.3	1	0	0	0	0	0	0	baja
alt.	hVK_1_8	11	7	8.9	13	0	0	0	1	n.d.	n.d.	n.d.

Figura 4

1358.0	IGKV3-20	IGKV1-39/1D-39	IGKV1-5	IGKV3-15	IGKV4-1	IGKV3-11	IGKV2-28/2D-28	IGKV1-33/1D-33	IGKV1-9	IGKV2-30	IGKV1-17	IGKV1-27	IGKV1-8	IGKV1-16	IGKV1-12	IGKV1-6	IGKV2D-29	IGKV1-13	IGKV2-24	IGKV1D-8	IGKV2-29	IGKV5-2	IGKV3D-20	IGKV1D-12	IGKV2-40/2D-40	IGKV1D-43	IGKV2D-30	IGKV1D-16	IGKV3D-15	IGKV1D-13	IGKV1D-17
>VH3-23	24	12	27	20	13	9	7	6	3	1	5	4	4	3	1	0	2	0	0	0	2	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0
>VH3-30	14	12	9	9	11	12	4	2	7	2	1	1	2	1	0	2	1	1	2	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
>VH4-39	13	18	14	22	5	6	5	4	0	2	1	4	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
>VH4-59	15	19	3	8	10	4	0	2	0	1	1	3	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
>VH4-34	25	18	9	8	7	6	6	3	2	0	2	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH5-51	10	7	4	7	8	6	4	3	1	2	1	1	0	0	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-69	12	14	5	7	8	8	3	3	0	1	0	2	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0
>VH3-7	6	10	10	8	5	4	3	0	2	4	2	2	3	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH1-18	15	8	5	4	2	4	5	7	0	2	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH3-48	12	8	1	6	6	7	3	6	2	0	2	1	3	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
>VH3-21	5	7	9	9	4	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-15	10	6	6	4	4	3	3	4	3	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH4-31	7	4	4	4	2	7	4	3	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH1-2	12	6	3	2	3	0	2	1	0	1	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-33	6	6	5	8	6	2	4	2	2	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-53	2	5	8	6	4	4	1	5	1	0	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
>VH3-11	3	5	6	5	2	3	3	1	1	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-9	1	3	3	2	3	2	1	0	0	0	1	1	1	2	1	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-74	4	3	3	3	3	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-4	6	5	4	3	3	3	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-46	6	5	3	3	1	2	0	1	4	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-61	0	3	0	2	5	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-8	2	1	1	4	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-24	1	3	0	3	1	4	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH1-3	2	4	1	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-49	2	4	2	1	0	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-28	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-43	0	0	3	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-64	0	0	2	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-81	3	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-13	0	3	1	0	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-72	1	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-73	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-58	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-66	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-4.1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH2-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH6-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-20	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 5

779.0	IGLV 2-14	IGLV 1-40	IGLV 1-44	IGLV 1-51	IGLV 1-47	IGLV 2-23	IGLV 3-21	IGLV 2-11	IGLV 3-1	IGLV 2-8	IGLV 6-57	IGLV 1-36	IGLV 3-25	IGLV 4-69	IGLV 7-43	IGLV 7-46	IGLV 2-18	IGLV 3-27	IGLV 9-49	IGLV 3-10	IGLV 3-9	IGLV 8-61	IGLV 3-12	IGLV 3-19	IGLV 3-22	IGLV 4-60
>VH3-23	13	6	5	3	1	4	6	5	5	1	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
>VH3-30	7	5	4	9	1	2	3	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0
>VH4-39	10	6	7	5	3	5	13	0	2	10	2	0	0	0	0	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH4-59	4	8	4	4	3	2	2	2	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
>VH4-34	10	6	2	9	6	2	2	1	0	4	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH5-51	11	14	5	0	4	3	3	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-69	8	7	8	5	2	3	2	5	2	4	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-7	2	4	3	3	3	1	3	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-18	5	5	3	3	0	1	0	1	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH3-48	6	1	1	1	6	1	1	2	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-21	5	2	2	9	3	1	2	2	1	1	1	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-15	1	2	4	2	1	1	1	0	2	2	1	0	1	0	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
>VH4-31	8	3	1	3	3	4	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-2	8	6	5	3	0	3	1	1	3	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-33	4	1	1	1	4	4	4	1	1	0	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
>VH3-53	2	0	9	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-11	3	1	3	1	1	2	2	3	3	1	0	0	1	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
>VH3-9	6	1	4	1	3	7	2	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH3-74	2	0	0	0	1	3	3	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-4	4	3	6	2	0	2	0	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-46	3	1	3	4	1	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-61	3	0	4	0	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-8	4	0	0	1	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-24	1	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-3	2	1	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-49	1	1	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-28	1	0	2	2	0	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-43	1	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-64	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-81	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-13	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-72	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-73	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-58	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-66	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-4.1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH2-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH6-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Figura 6A**

Tomlinson			
	Matsuda et al	et al	Secuencia proteica
IGHV1-2	VH 1-2	DP-75	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAR
IGHV1-3	VH 1-3	DP-25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWRQAPGQRLWWMGWSNAGNGNTKYSQEFQGRVTITRSDTSASTAYMELSLRSEDMAVYYCAR
IGHV1-8	VH 1-8	DP-15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTNRNTSISTAYMELSLRSEDVAVYYCARG
IGHV1-18	VH 1-18	DP-14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCAR
IGHV1-24	VH 1-24	DP-5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTSLMHWRQAPGKGLEWMG GFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDAYMELSLRSEDVAVYYCAT
IGHV1-45	VH 1-45	--	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTYRYLHWVRQAPGQALEWMGWITPFGNGNTNYAQKFQDRVTITDRSMSTAYMELSLRSEDVAVYYCAR
IGHV1-46	VH 1-46	DP-7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTSDTSTSTVYMELSLRSEDVAVYYCAR
IGHV1-58	VH 1-58	DP-2	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTSSAMQWVRQARGQRLWIGWIVVGSNGNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYMELSLRSEDVAVYYCAA
IGHV1-69*01	VH 1-69	DP-10	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYSAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSLRSEDVAVYYCAR
IGHV1-69*06, IGHV1-e	VH 1-69	DP-88	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYSAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYYCAR
IGHV1-c	--	--	KSGASVKVSCSFSGFTTISYGIHWVQQSPGQGLEWMGWINPNGNSPSYAKKFQGRFTMTDRMSTTTAYTDLSSLTSEDMAVYYYYAR
IGHV1-f	--	DP-3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFDYYMHVWQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDAYMELSLRSEDVAVYYCAT
IGHV2-5	VH 2-5	DP-76	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALIYWDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAHR
IGHV2-26	VH 2-26	DP-26	QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYYCARI
IGHV2-70	VH 2-70	DP-27	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMCVSWIRQPPGKALEWLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCARI
IGHV3-7	VH 3-7	DP-54	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYWMWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDVAVYYCAR
IGHV3-9	VH 3-9	DP-31	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWRQAPGKGLEWVSGISWNSGSGIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD

**Figura 6B**

IGHV3-11	VH 3-11	DP-35	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWWSYI SSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-13	VH 3-13	DP-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQATGKGLEWWSA IGTAGDTYYPGSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-15	VH 3-15	DP-38	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVG RIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
IGHV3-16	VH 3-16		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNDNMWARKAPGKGLEWWSG VSWNGSRTHYVDSVK.RRFIISRDNRSNLSLYLQKNRRRAEDMAVYYCVR
IGHV3-20	VH 3-20	DP-32	EVQLVESGGGVVPRGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVS GINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCA
IGHV3-21	VH 3-21	DP-77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI SSSSSYIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-23	VH 3-23	DP-47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV3-30	VH 3-30	DP-49	QVQLVESGGGVVQPRGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-30-3	--	DP-46	QVQLVESGGGVVQPRGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-30-5	--	--	QVQLVESGGGVVQPRGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV3-33	VH 3-33	DP-50	QVQLVESGGGVVQPRGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-35	VH 3-35	DP-59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNDNMWVHQAPGKGLEWWSG VSWNGSRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQTNLSLRAEDTAVYYCVR
IGHV3-38	VH 3-38P	--	EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCAASGFTVSSNEMSWIRQAPGKGLEWVSSI SGGSTYYADSRKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAAYYCARY
IGHV3-43	VH 3-43	DP-33	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQAPGKGLEWVSLI SWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKD
IGHV3-48	VH 3-48	DP-51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWWSY ISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
IGHV3-49	VH 3-49	3-49RB	EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFRQAPGKGLEWVGF IRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
IGHV3-53	VH 3-53	DP-42	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWWSVI YSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-64	VH 3-64	DP-61	EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWWSAI SSNGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR
IGHV3-66	VH 3-66	DP-86	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWWSVI YSCGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-72	VH 3-72	DP-29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWVG RTRNKANSYTTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
IGHV3-73	VH 3-73	DA-11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGR IRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
IGHV3-74	VH 3-74	DP-53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVS RINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

**Figura 6C**

IGHV3-d	--	--	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNEMSWVRQAPGKGLEWSSI SGGSTYYADSRKGRFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK
IGHV4-4	VH 4-4	DP-70	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIY TSGSTNYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-28	VH 4-28	DP-68	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISSNWWGWIRQPPGKGLEWIGYI YYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-30-1	--	--	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG YIYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-30-2	--	DP-64	QLQLQESGGLVKPSQTLSTCAVSGGSISSGGYSWSWIRQPPGKGLEWIG YIYHSGSTYYNPSLKSRTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-30-4	--	DP-78	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-31	VH 4-31	DP-65	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG YIYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-34	VH 4-34	DP-63	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI NHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG
IGHV4-39	VH 4-39	DP-79	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPGKGLEWIGS IYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-59	VH 4-59	DP-71	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIY YSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-61	VH 4-61	DP-66	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-b	--	DP-67	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSISSGGYYWGWRQPPGKGLEWIGSI YHSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV5-51	VH 5-51	DP-73	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDDTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
IGHV5-a	--	--	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGRI DPDSYTNYSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
IGHV6-1	VH 6-1	DP-74	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWL RTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
IGHV7-4-1	--	DP-21	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTSYAMNWWVRQAPGQGLEWMG WINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR
IGHV7-81	VH 7-81	--	QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCASGYSTTYGMNWWPQAPGQGLEWMG WFNTYTGNPTYAQGFTGRFVFSMDTSASTAYLQISSLKAEDMAMYYCAR

51 funcionales

5 marcos de lectura abierta

**Figura 7A**

	Zachau	Secuencia proteica
IGKV1-5	L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQQYNSYS
IGKV1-6	L11	AIQMTQSPSSLASVGDRVITICRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYP
IGKV1-8	L9	AIRMTQSPSSFASVGDRVITICRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQYYSYP
IGKV1-9	L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYP
IGKV1-12	L5	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP
IGKV1-13	L4/18a	AIQLTQSPSSLASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSL ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNNSYP
IGKV1-16	L1	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICRASQGSISSYLAWYQQKPGKAPKSLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP
IGKV1-17	A30	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP
IGKV1-27	A20	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICRASQGSISSYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAP
IGKV1-33	O18	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYDNLN
IGKV1-37	O14	DIQLTQSPSSLASVGDRVITICRVSQGISSYLWYRQKPGKVPKLLIYASNL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYGQRTYNAPP
IGKV1-39	O12	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICRASQSISSYLWYRQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP
IGKV1D-08	L24	VIWMTQSPSLLSASTGDRVITICRMSQGISSYLAWYQQKPGKAPELLIYAASL LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQYYSFP
IGKV1D-12	L19	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP
IGKV1D-13	L18	AIQLTQSPSSLASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSL ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNNSYP
IGKV1D-16	L15	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICRASQGSISSYLAWYQQKPEKAPKSLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP
IGKV1D-17	L14	NIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRARQGISSYLWYRQKPGKVPKHLYIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP
IGKV1D-33	O8	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYDNLN
IGKV1D-37	O4	DIQLTQSPSSLASVGDRVITICRVSQGISSYLWYRQKPGKVPKLLIYASNL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYGQRTYNAPP

**Figura 7B**

IGKV1D-39	O2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP
IGKV1D-42	L22	DIQMIQSPSFLSASVGDRVSIICWASEGISSNLAWYLQKPGKSPKFLYDAKDL HPGVSSRFSGRSGSGTDFTLTIIISLKPEDFAAAYCKQDFSYP
IGKV1D-43	L23	AIRMTQSPFSLASVGDRVITICWASQGISSYLAWYQQKPAKAPKLFYYASSL QSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTP
IGKV2-24	A23	DIVMTQTPLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLI YKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFP
IGKV2-28	A19	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLHSDNGNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP
IGKV2-29	A18b	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLI YEVSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGHLP
IGKV2-30	A17	DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQSLVSDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP
IGKV2-40	O11	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLDSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI YTLISYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP
IGKV2D-24	A7	DIVMTQTPLSPVTLGQPASISFRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCTQATQFP
IGKV2D-26	A5	EIVMTQTPLSLSPITGQASISCRSSQSLHSDGYTYLYWFLQKARPVSTLLIYE VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFGVYYCMQDAQDPP
IGKV2D-28	A3	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLHSDNGNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP
IGKV2D-29	A2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLI YEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLP
IGKV2D-30	A1	DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQSLVSDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVSNRDWSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP
IGKV2D-40	O1	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLDSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI YTLISYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP
IGKV3-7	L10	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSRASQSVSSSYLTWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQDHNLP
IGKV3-11	L6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWP
IGKV3-15	L2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWP



**Figura 7C**

IGKV3-20	A27	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
IGKV3D-07	L25	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQDYNLP
IGKV3D-11	L20	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGPGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWH
IGKV3D-15	L16	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWP
IGKV3D-20	A11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGAPRLLIYDAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
IGKV4-1	B3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP
IGKV5-2	B2	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPGEAIFIIQEATTL VPGIPPRFSGSGYGTFTLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFP
IGKV6-21	A26	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQS FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP
IGKV6D-21	A10	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQS FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP
IGKV6D-41	A14	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCQASEGIGNLYWYQQKPDQAPKLLIKYASQ SISGVPSRFSGSGSGTDFTTISLQSEDAATYYCQQGNKHP

38 funcionales  
8 marcos de lectura abierta

**Figura 8A**

	Kawasaki et al	Frippiat et al	Secuencia proteica
IGLV1-36	VL 1-11	1a	QSVLTQPPSVSEAPRQRTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDD LLPSGVSDRFGSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP
IGLV1-40	VL 1-13	1e	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWWYQQLPGTAPKLLIYG NSNRPSGVDRFGSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGSGS
IGLV1-44	VL 1-16	1c	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNN QRPSGVDRFGSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP
IGLV1-47	VL 1-17	1g	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNYVYWWYQQLPGTAPKLLIYSNN QRPSGVDRFGSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGP
IGLV1-50	VL 1-18	1f	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYVHWWYQQLPGTAPKLLIYG NSNRPSGVDPQFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCKAWDNLNA
IGLV1-51	VL 1-19	1b	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNN KRPSGIPDRFGSGSKSGTSATLCITGLQTQDEADYYCGTWDSSLGAC
IGLV2-08	VL 1-2	2c	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY EVSKRPSGVDRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYAGSNNF
IGLV2-11	VL 1-3	2e	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY DVSKRPSGVDRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSYTF
IGLV2-14	VL 1-4	2a2	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMY VSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYTSSSTL
IGLV2-18	VL 1-5	2d	QSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSYNRVSWYQQHPGKAPKLMY VSNRPSGVDRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSLYTSSSTF
IGLV2-23	VL 1-7	2b2	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMY GSKRPSGVSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSSTF
IGLV2-33	VL 1-9	2f	QSALTQPPFVSGAPGQSVTISCTGTSSDVGDYDHFVWYQKRLSTTSRLLIYN VNTRPSGISDLFSGSKSGNMASTISGLKSEVEANYHCSLYSSSYTF
IGLV3-1	VL 2-1	3r	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLDKDYACWYQKPGQAPVLIYQDSK RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTA
IGLV3-9	VL 2-6	3j	SYELTQPLSVSVLGGTARITCGGNNIGSKNVHWWYQKPGQAPVLIYRDSN RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTA
IGLV3-10	VL 2-7	3p	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQKPGQAPVLIYEDSK RPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEADYYCYSTDSGNGH
IGLV3-12	VL 2-8	3i	SYELTQPHSVSVATAQMARITCGGNNIGSKAVHWWYQKPGQAPVLIYSDSN RPSGIPERFSGSNPGNTATLTISRIEAGDEADYYCQVWDSSTDHP
IGLV3-16	VL 2-11	3a	SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGEALPKKYAYWYQKPGQAPVLIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGVQAEDEADYYCLSDSSGTYP
IGLV3-19	VL 2-13	3l	SSELTQDPAVSVLGGTARITCQGDLSRYYASWYQKPGQAPVLIYGKNN RPSGIPDRFGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHL
IGLV3-21	VL 2-14	3h	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWWYQKPGQAPVLIYVDDSD DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSTDHP
IGLV3-22	VL 2-15	3e	SYELTQLPSVSVSPGQTARITCSGDVLDGENYADWYQKPGQAPVLIYEDSE RYPGIPERFSGSTSGNTTTLTISRVLTEADYYCLSGDEDNP
IGLV3-25	VL 2-17	3m	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQKPGQAPVLIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGVQAEDEADYYCQSDSSGTYP
IGLV3-27	VL 2-19	--	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKYARWFQKPGQAPVLIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGAQVEADYYCYSAADNNL

**Figura 8B**

IGLV3-32	VL 2-23P	3i1	SSGPTQVPAVSVALGQMARITCQGDSMEGSYEHWWYQQKPGQAPVLVIYDSS DRPSRIPERFSGSKSGNTTTLTITGAQAEDEADYYYQLIDNHA
IGLV4-3	VL 5-1	4c	LPVLTQPPSASALLGASIKLTCTLSSEHSTYIEWYQQRPGRSPQYIMKVKSD GSHSKGDGIPDRFMGSSSGADRYLTFSNLQSDDEAEYHCGESHTIDGQVG
IGLV4-60	VL 5-4	4a	QPVLTSQSSASASLGSSVKLTCTLSSGHSSYIAWHQQQPGKAPRYLMKLEG SGSYNKGSGVPDRFSGSSSGADRYLTISNLQFEDEADYCYETWDSNT
IGLV4-69	VL 5-6	4b	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYIAWHQQQPEKGPRLMKLNS DGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYCYQWTGTG
IGLV5-37	VL 4-1	5e	QPVLTPPSSASPGESARLTCTLPDINVGSYNIYWWYQQKPGSPPRYLLYY SDSDKQGSGVPSRFGSGKDASANTGILLISGLQSEDEADYCYMIWPSNAS
IGLV5-39	--	5a	QPVLTPQTSLSASPGASARFTCTLRSGINVGTYRIYWWYQQKPGSLPRYLLRYK SDSDKQGSGVPSRFGSGKDASTNAGLLISGLQSEDEADYCYAIWYSSTS
IGLV5-45	VL 4-2	5c	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGTYRIYWWYQQKPGSPQYLLRYK SDSDKQGSGVPSRFGSGKDASANAGILLISGLQSEDEADYCYMIWHSSAS
IGLV5-48	VL 4-3	5d	QPVLTPQTSLSASPGASARLTCTLRSGINLGSYRIFWYQQKPGSPPRYLLSY SDSKHQGSGVPSRFGSGKDASSNAGILVISGLQSEDEADYCYMIWHSSAS
IGLV5-52	VL 4-4	5b	QPVLTPSSHSASSGASVRLTCLMLSSGFSVGDWIRWYQQKPGNPPRYLLY YHSDSNKGQSGVPSRFGSGNDASANAGILRISGLQPEDEADYCYGTWHSN SKT
IGLV6-57	VL 1-22	6a	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPSSPTTVIYED NQRPSGVDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYCYQSYDSSN
IGLV7-43	VL 3-2	7a	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASTGAVTSGYYPNWFQQKPGQAPRALIYS TSNKHSWTPARFSGSLLGKAALTLSGVQPEDEAEYCYLLYGGAAQ
IGLV7-46	VL 3-3	7b	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHYPYWFQQKPGQAPRTLIDY TSNKHSWTPARFSGSLLGKAALTLLGAQPEDEAEYCYLLSYSGAR
IGLV8-61	VL 3-4	8a	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYPSWYQQTPGQAPRTLISY TNTRSSGVDRFSGSILNKAAALTITGAQADDESYYCVLYMGSGIS
IGLV9-49	VL 5-2	9a	QPVLTPPSSASASLGASVTLTCTLSSGYSNYKVDWYQQRPKGPRFVMRVG TGGIVGSKGDGIPDRFVLGSLNRYLTIKNIQEEDES DYHCGADHSGSGSNFV
IGLV10-54	VL 1-20	10a	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNIVGNQGAALQQHQHPPKLLSYR NNNRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYCYCALDSSLSA
IGLV11-55	VL 4-6	--	RPVLTQPPSLASPGATARLPCTLSSDLSVGKKNMFYQQKPGSSPRLFLY HYSDSDKQLGPGVPSRVSGSKETSSNTAFLLISGLQPEDEADYCYQVYESSA N

Figura 9

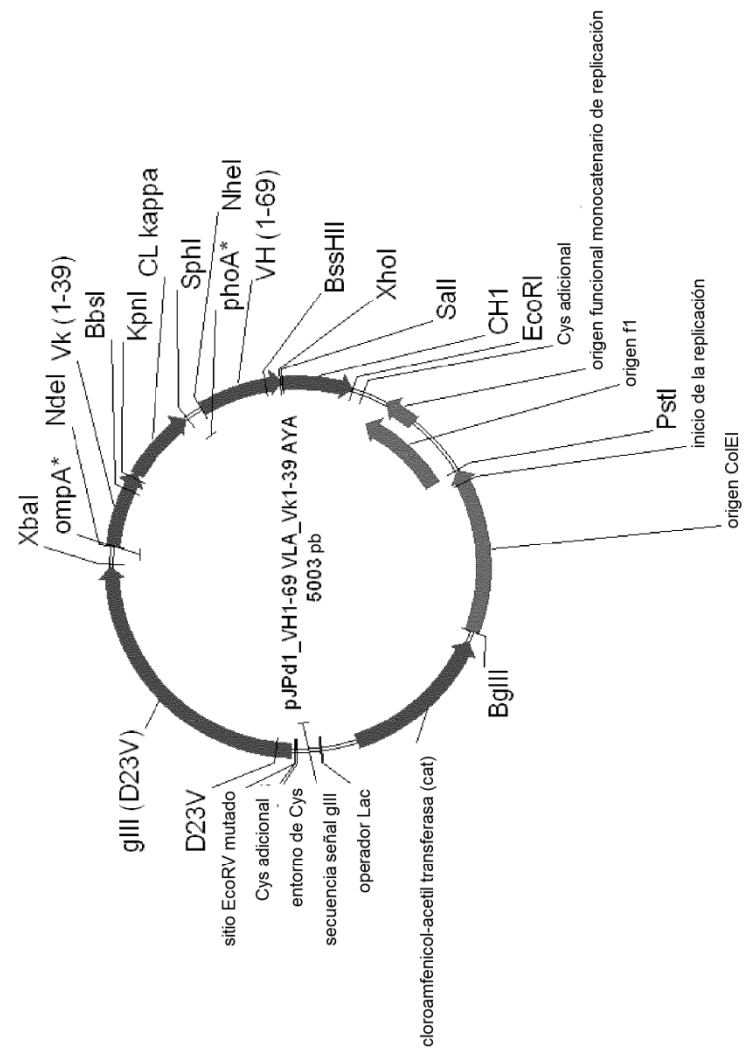


Figura 10

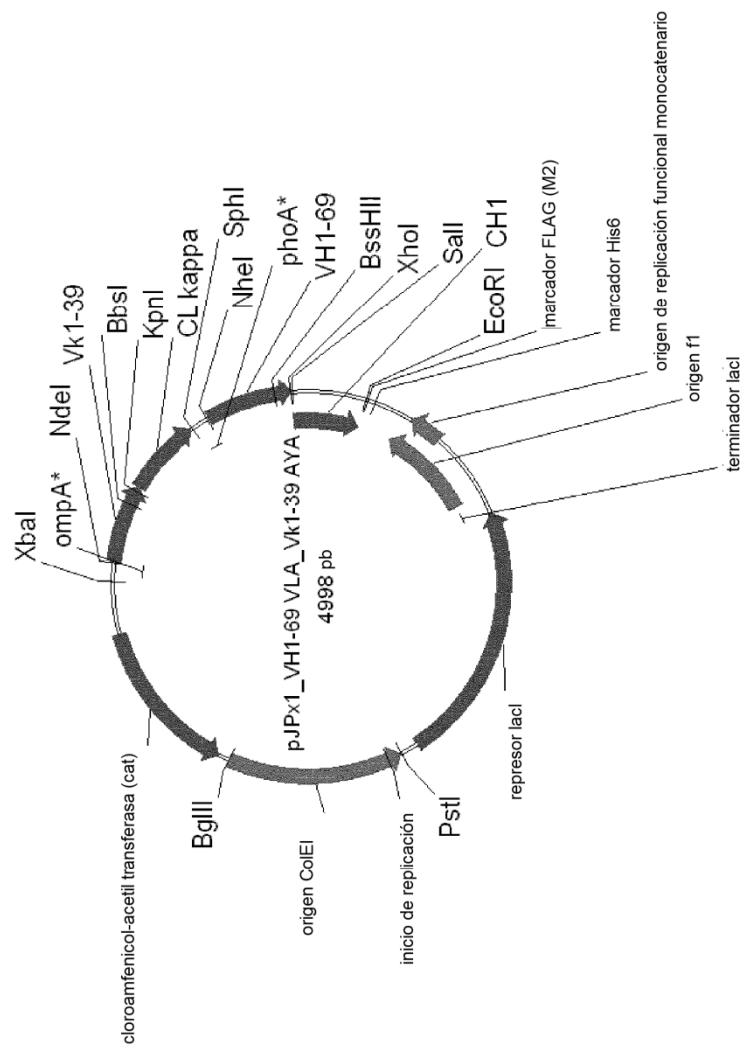
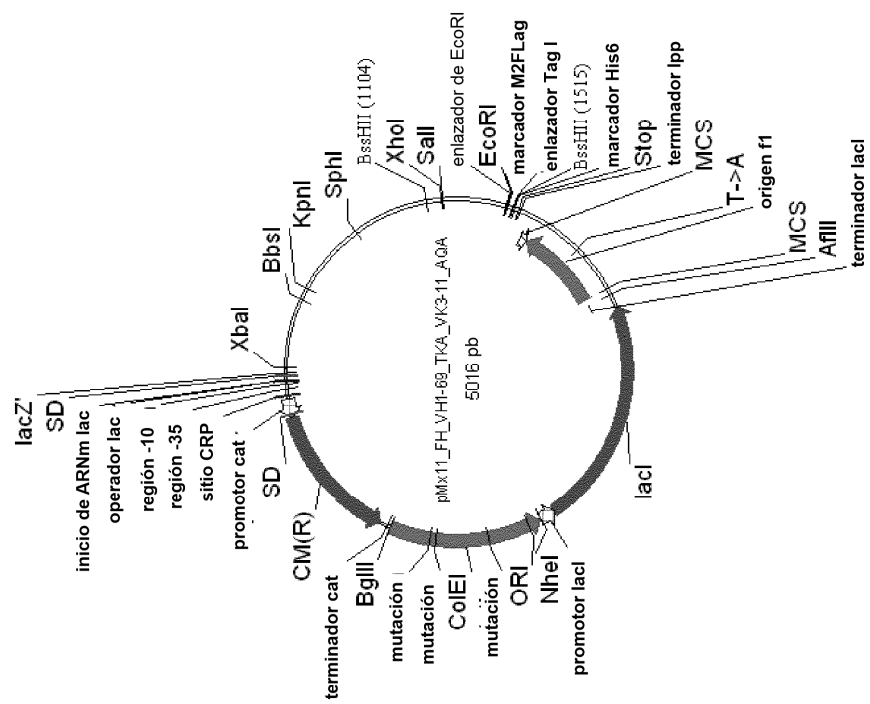


Figura 11



## Figura 12

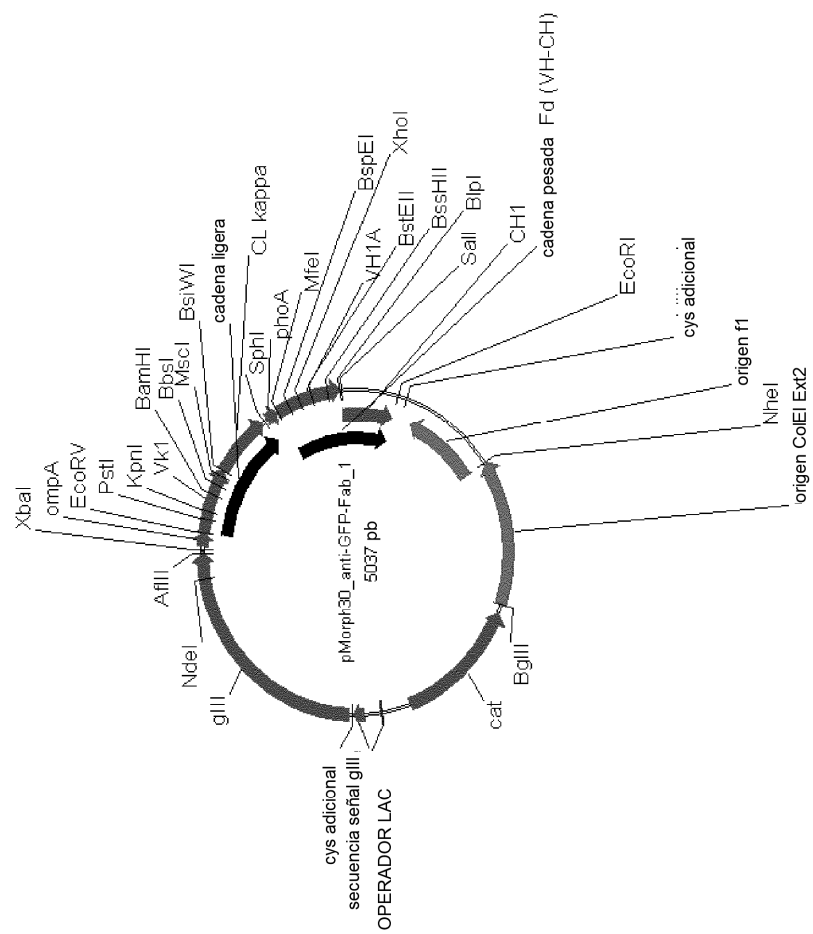


Figura 13

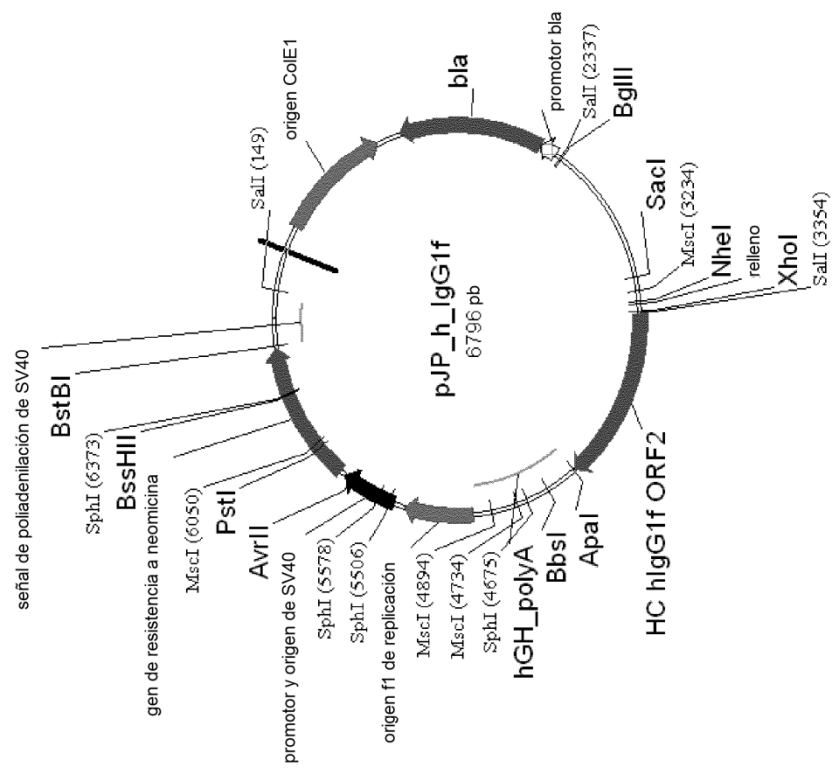




Figura 14

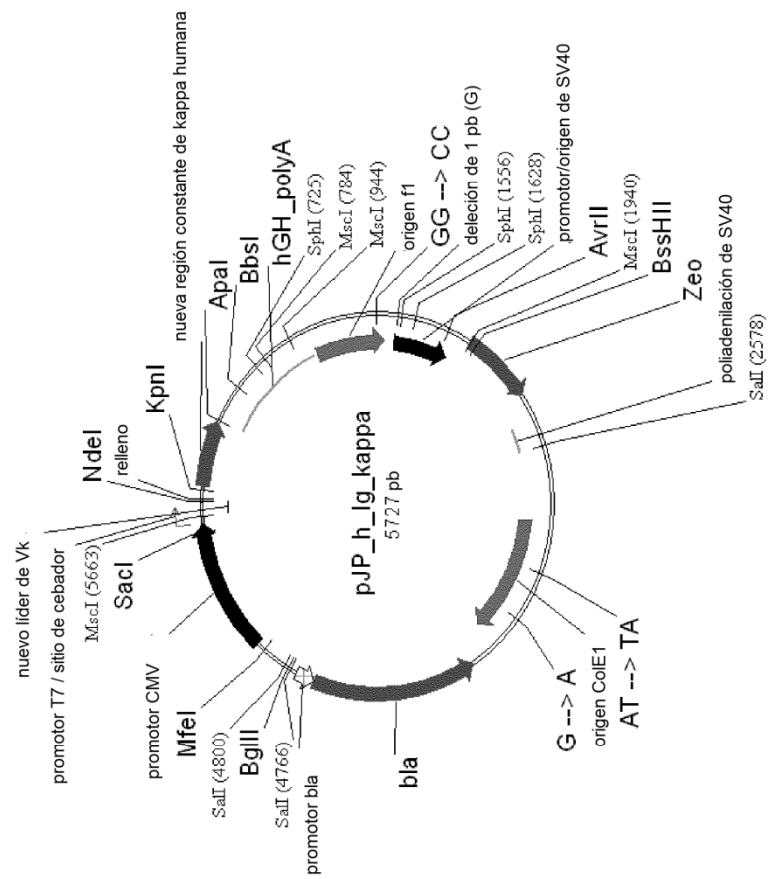


Figura 15

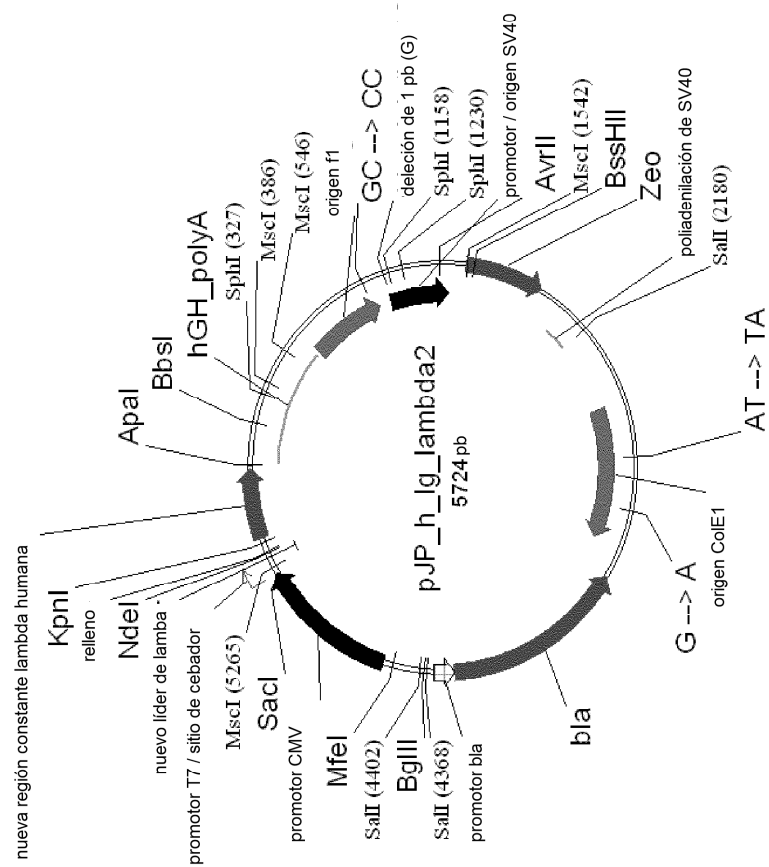


Figura 16

N.º	VH	VL	Expresión de Fab purificado en mg/L	% monomérico de Fab purificado	Thermo-fluor de Fab purificado	Expresión de IgG1 purificada en mg/L	% mono-IgG1 purificada	Thermo-fluor de IgG1 purificada	Punto isoelectrico de IgG1
1	VH_1_18	VK_1_39	2,5	100	75,2 / 75,4	36	100	78,4	9,2
2	VH_1_18	VK_3_11	3	97	75,2				
3	VH_1_18	VK_3_15	5	99	76,39	36,1	99	81,9	9,2
4	VH_1_18	VK_3_20	5	100	73,8 / 73,6	44	100	77	9
5	VH_1_18	VL_1_40				59,1	90	83,6	8,9
6	VH_1_18	VL_1_47	6,5	98	74,1 / 74,3	52,9	98	83,9	9,3
7	VH_1_18	VL_2-23	4,0 / 5,0 / 4,5	98,0 / 99,0 / 97,0	73,8 / 71,0	45,9	93	80,4	9
8	VH_1_46	VK_3-7	2,5	97	75	60,8	96	84,5	8,2
9	VH_1_46	VK_1_09	2,5	95	73,1	42,8	100	77,6	8,9
10	VH_1_46	VK_3_15	3	100	74,5 / 74,3	60,9	100	76,5	8,9
11	VH_1_46	VL_1-40	6,5	99	73,9 / 73,4	50,7	93	80,5	8,2
12	VH_1_46	VL_1-51	4,5	100	73,56	65	100	79,5	8,6
13	VH_1_46	VL_2-23	7	100	72,9 / 72,7	49,6	98	78,5	8,6
14	VH_1_46	VL_3-1				78,8	98	75,8	8,2
15	VH_1_46	VL_3-21	3	98		50,4	100	74,5	8,2
16	VH_1_69*01	VK_1_27	3,5	98	74,8				
17	VH_1_69*01	VK_3_11	2,5	97	72,9	22,6	100	77,8	8,2
18	VH_1_69*01	VL_1-40	4,5 / 6,5	90,0 / 99,0	73,8 / 72,7	34,7	95	81,7	8,2
19	VH_1_69*01	VL_1-51	7,5	99	73,3 / 72,9	53,9	99	77,9	8,6
20	VH_1_69*01	VL_3-1	2,0 / 3,0	99,0 / 96,0	74,4	36,4	99	79,6	7,4
21	VH_1_69*01	VL_3-21	4	98	73,3 / 73,1	34,5	98	76	8,2
22	VH_3_07	VK_1_12	6,5	100	74,0 / 74,1	57	100	77,6	8,9
23	VH_3_07	VK_1_16	7	98		50	100	74	8,9
24	VH_3_07	VK_1_27	6	99	76,0 / 76,0	64	100	80	8,9
25	VH_3_07	VK_1_39	7	98	74,2 / 74,3	53,3	100	80	8,9
26	VH_3_07	VK_3_15	6	100	74,8 / 75,3	65,5	100	79	8,9
27	VH_3_07	VK_3_20				32,7	100	78,4	8,7
28	VH_3_07	VL_1-47	9,5	99	72,0 / 71,3	56,7	99	79,4	9,1
29	VH_3_07	VL_1-51	8,5	99	72,0 / 71,3	63,3	100	79,9	8,7
30	VH_3_07	VL_2-23	3	97	72,5 / 72,2	43,3	90	81,4	8,7
31	VH_3_07	VL_3-1	1,5	94	n.a.	43,5	97	n.a.	7,6
32	VH_3_11	VK_1_05	4,5	98	70,0 / 70,1	56,4	100	74,3	8,6

Figura 17

N.º	VH	VL	Expresión de Fab purificado en mg/L	% monomérico de Fab purificado	Thermo-fluor de Fab purificado	Expresión de IgG1 purificada en mg/L	% monomérico de IgG1 purificada	Thermo-fluor de IgG1 purificada	Punto isoelectrico de IgG1
33	VH 3 11	VK 1 39	3,5	100	74,1 / 73,8	55,7	99	79	9
34	VH 3 11	VK 3 15	6,5	99	72	57,4	100	78,6	9,1
35	VH 3 11	VL 1-40	7	99	71,8 / 71,5	30	99	79,2	8,6
36	VH 3 11	VL 1-47	7,5	99	71,7 / 72,2	52,7	99	77,2	9,2
37	VH 3 11	VL 1-51	13	100	71,7 / 72,2	59,1	100	77	8,9
38	VH 3 11	VL 2-23	7	99	70,2 / 70,5	50	99	74,5	8,9
39	VH 3 15	VK 1 05	8,5	100	72,3 / 72,7	59,1	100	76	8,9
40	VH 3 15	VK 1 08	5	100	72,3	38	100	74,5	9,3
41	VH 3 15	VK 1 09	9,5	100	75,8 / 76,7	20	99	82	9,2
42	VH 3 15	VK 1 12	9	99	75,6 / 75,3	54,5	100	79,2	9,2
43	VH 3 15	VK 1 16	8,5	99	73,3 / 73,1	52,7	100	76,5	9,2
44	VH 3 15	VK 1 27	4,5	100	76,24	32	100	78,5	9,2
45	VH 3 15	VK 3 11	5,5	99	76	31,2	100	79,5	8,9
46	VH 3 15	VK 3 15	6	100	77	20	100	80	9,2
47	VH 3 15	VL 1-40	10,5	100	73,5 / 73,6	32	99	80,3	8,9
48	VH 3 15	VL 1-47	9	99	72,6 / 72,9	61,8	99	78	9,3
49	VH 3 15	VL 1-51	6	100	74,11	46	100	78,9	9,1
50	VH 3 15	VL 2-14	3,0 / 3,5 / 3,0	96,0 / 98,0 / 100	72,3 / 72,2	61	99	75,5	8,9
51	VH 3 21	VK 1 06	2	98	72,9 / 73,1	56	100	74,7	9,2
52	VH 3 21	VK 1 12	5,5	100	73,6	45,6	100	77,2	9,1
53	VH 3 21	VK 1 27	3	98	74,0 / 73,4	47,6	100	77,8	9
54	VH 3 21	VL 2-11	4	98	73,0 / 73,1	49,5	99	80	8,9
55	VH 3 21	VL 2-14	3,5 / 5,5	98,0 / 99,0	72,6 / 72,0	61	98	77	8,7
56	VH 3 21	VL 2-23	3,5	99	72,4 / 72,6	40	97	77,3	8,9
57	VH 3 21	VL 3-1	3,4 / 2,5	87,0 / 88,0	60,66	48	97	77,5	7,9
58	VH 3 23	VK 1 39	3	98	75,6	43,8	100	83,8	8,9
59	VH 3 23	VK 3 15	6	99	76,45	30	100	85	8,9
60	VH 3 23	VK 3 20	4,5	97	77,4	34,5	100	82	8,7
61	VH 3 23	VL 2-11	3	96	71,3	45,5	99	82,6	8,7
62	VH 3 23	VL 2-14	3,5	97	71,5	53,3	99	78	8,3
63	VH 3 23	VL 2-23	3,5	98	71,7 / 72,4	52,7	99	79	8,7
64	VH 3 23	VL 3-1	3	98	71,5	40	100	81	7,6

Figura 18

N.º	VH	VL	Expresión de Fab purificado en mg/L	% monomérico de Fab purificado	Thermo-fluor de Fab purificado	Expresión de IgG1 purificada en mg/L	% monomérico de IgG1 purificada	Thermo-fluor de IgG1 purificada	Punto isoelectrico de IgG1
65	VH_3_23	VL_3_21	5,5	97	72,05	34,5	100	79,1	8,3
66	VH_3_30	VK_3_15	7	98	71,3	27,8	100	80,7	9,2
67	VH_3_30	VK_3_20	3	97/100	72,5	31,7	100	81	9,1
68	VH_3_30	VL_2_23	3,5	98	72,0 / 72,2	45,7	96	80,5	9
69	VH_3_30	VL_3_1	2,4 / 1,0	94		57,1	98	79,5	8,2
70	VH_3_30	VL_3_21	4,5	97	72,6 / 72,0	50	100	78	8,9
71	VH_3_53	VK_1_39	5,5	98	68,8	57,1	100	74,1	8,9
72	VH_3_53	VK_3_15	4,5	100	70,05	61	100	73,8	8,9
73	VH_3_53	VL_2_11	7,5	100	71	50	100	74,3	8,7
74	VH_3_53	VL_2_23	6	100	67,98	40	99	80,8	8,7
75	VH_3_53	VL_3_1	2,5	97	70,18	49,5	96	81,2	7,6
76	VH_3_74	VK_1_05	4	99	72,9	61,8	100	75,5	8,7
77	VH_3_74	VK_1_06	3,5	99	74,01	52,2	100	77	9,2
78	VH_3_74	VK_1_12	5,5	99	74,48	62	100	78,5	9,1
79	VH_3_74	VK_1_27	3,5	98	76,02	56	100	78,5	9,1
80	VH_3_74	VK_3_20	3,5	100	73	43,8	100	80,1	8,9
81	VH_3_74	VL_1_51	4,5	98	72,25	62,9	99	80,9	8,9
82	VH_3_74	VL_3_1	2,4 / 3,5	98,0 / 81,0	71,84	53,9	95	79	7,9
83	VH_5_51	VK_1_39	2,5	99	70,08	36,4	100	73,3	8,9
84	VH_5_51	VL_1_40	4	99	73,09	38,3	99	77,7	8,3
85	VH_5_51	VL_1_47	6	99	73,3	40	97	76,5	9
86	VH_5_51	VL_1_51	5,5	100	72,47	59	99	75,4	8,6
87	VH_5_51	VL_3_1	2	100		34	97	76	7,6
88	VH_6_1	VK_1_06	2	98	71,97	80	100	n.a.	9,3
89	VH_6_1	VK_1_09	7	99	76,4	66,7	100	80,3	9,2
90	VH_6_1	VK_1_27	7,5 / 5,0	100 / 80	76,13	84	99	80,2	9,2
91	VH_6_1	VK_3_15	6	100	75,75	38,3	100	76,4	9,2
92	VH_6_1	VK_3_20	8	100	72,69	70,5	100	77,5	9,1
93	VH_6_1	VL_1_47	7,5	100	70,28	38	98	73,9	9,3
94	VH_6_1	VL_1_51	8	100	73,6	62,9	99	76,9	9
95	VH_6_1	VL_3_1	2,3 / 3,0	97,0 / 98,0	70,9	26	97	n.a.	8,2

Figura 19

N.º	VH	VL	Tm antes de ácido	Tm después de ácido	Cambio	Absorción inicial	Absorción 15 min de ácido	Absorción 100 min de ácido	Absorción neutralización
1	VH_1_18	VK_1_39		79,2		0,041	0,061	0,05	0,042
2	VH_1_18	VK_3_11							
3	VH_1_18	VK_3_15	81,9	81,9	0	0,036	0,054	0,042	0,038
4	VH_1_18	VK_3_20		77,7		0,037	0,043	0,042	0,037
5	VH_1_18	VL_1_40	83,7	84	-0,3	0,036	0,051	0,039	0,038
6	VH_1_18	VL_1_47	84,2	84,2	0	0,036	0,051	0,04	0,038
7	VH_1_18	VL_2_23	80,9	80,7	0,2	0,036	0,049	0,04	0,039
8	VH_1_18	VL_3_1	84,9	84,7	0,2	0,036	0,049	0,04	0,038
9	VH_1_46	VK_1_09	78,2	78,1	0,1	0,036	0,053	0,045	0,042
10	VH_1_46	VK_3_15	77,4	77,6	-0,2	0,036	0,045	0,041	0,037
11	VH_1_46	VL_1_40	80,6	80,7	-0,1	0,036	0,045	0,04	0,039
12	VH_1_46	VL_1_51	79,4	79,3	0,1	0,036	0,04	0,039	0,038
13	VH_1_46	VL_2_23	78,7	78,6	0,1	0,037	0,057	0,041	0,038
14	VH_1_46	VL_3_1	76	75,9	0,1	0,043	0,062	0,067	0,096
15	VH_1_46	VL_3_21	74	74,2	-0,2	0,039	0,044	0,042	0,043
16	VH_1_69*01	VK_1_27							
17	VH_1_69*01	VK_3_11	77,6	78	0	0,037	0,048	0,039	0,038
18	VH_1_69*01	VL_1_40	81,7	81,7	0	0,039	0,05	0,048	0,042
19	VH_1_69*01	VL_1_51	78,2	78,1	0,1	0,037	0,045	0,042	0,04
20	VH_1_69*01	VL_3_1	79,2	79,1	0,1	0,041	0,047	0,046	0,048
21	VH_1_69*01	VL_3_21	78,4	76,4	2	0,04	0,06	0,045	0,038
22	VH_3_07	VK_1_12	77,8	78,2	-0,4	0,036	0,047	0,041	0,037
23	VH_3_07	VK_1_16		74,4		0,036	0,046	0,043	0,038
24	VH_3_07	VK_1_27	80,2	80,4	-0,2	0,039	0,041	0,04	0,04
25	VH_3_07	VK_1_39	80	80,2	-0,2	0,037	0,038	0,038	0,039
26	VH_3_07	VK_3_15	79,5	79,7	-0,2	0,037	0,038	0,037	0,038
27	VH_3_07	VK_3_20	78,5	78,9	-0,4	0,038	0,042	0,043	0,041
28	VH_3_07	VL_1_47	78,8	79,1	-0,3	0,037	0,039	0,037	0,037
29	VH_3_07	VL_1_51	79,8	79,8	0	0,039	0,041	0,041	0,04
30	VH_3_07	VL_2_23	81,2	81,2	0	0,043	0,049	0,043	0,041
31	VH_3_07	VL_3_1	81,2	81,2	0	0,036	0,042	0,037	0,038
32	VH_3_11	VK_1_05	74,5	75	-0,5	0,036	0,037	0,037	0,036

Figura 20

N.º	VH	VL	Radio inicial [nm]	% de poli-dispersidad inicial	Radio [nm] después de ácido	% de poli-dispersidad después de ácido	Tinción de partículas antes de ácido	Tinción de partículas después de ácido	Puntuación acumulada
1	VH_1_18	VK_1_39	5,7	4,8	5,4	9,1	1	3,00	1050
2	VH_1_18	VK_3_11							
3	VH_1_18	VK_3_15	5,2	4,1	5,3	7,2	1	2	1100
4	VH_1_18	VK_3_20	5,4	2,8	5,3	7,1	2	3	1450
5	VH_1_18	VL_1_40	5,6	5,7	5,7	7,8	1	2	1525
6	VH_1_18	VL_1_47	5,3	4,3	5,5	7,4	1	2	1450
7	VH_1_18	VL_2_23	5,4	2,7	5,6	9,5	1	1	1450
8	VH_1_18	VL_3_1	5,4	5,5	5,5	9,5	1	1	1600
9	VH_1_46	VK_1_09	5,1	2,2	5,3	6,8	1	1	1475
10	VH_1_46	VK_3_15	5,3	6,9	5,4	10,6	1	1,5	1550
11	VH_1_46	VL_1_40	5,6	8,4	5,4	8,5	1	1	1600
12	VH_1_46	VL_1_51	5,1	2,4	5,3	7,4	2,5	3	1500
13	VH_1_46	VL_2_23	5,2	2,1	5,2	5,3	2	1	1450
14	VH_1_46	VL_3_1	12,2	39,8	39	mm	2	4	400
15	VH_1_46	VL_3_21	9,3	mm	8,3	mm	1	3	875
16	VH_1_69*01	VK_1_27							
17	VH_1_69*01	VK_3_11	5,3	5,6	5,4	11,3	1	2	1525
18	VH_1_69*01	VL_1_40	7,1	10,6	7,8	16	3	2,5	1150
19	VH_1_69*01	VL_1_51	5,3	3,6	5,3	6,3	1	1	1575
20	VH_1_69*01	VL_3_1	7,3	26,2	33	mm	1	1	575
21	VH_1_69*01	VL_3_21	5,5	8,7	5,7	16,3	1	1	1025
22	VH_3_07	VK_1_12	5,1	2,6	5,2	5,6	2,5	1	1425
23	VH_3_07	VK_1_16	5,6	14,1	5,2	5,9	1,5	2,5	1575
24	VH_3_07	VK_1_27	5,1	2,2	5,3	9	1	2	1450
25	VH_3_07	VK_1_39	5,2	2,7	5,3	6,3	1	3,5	1450
26	VH_3_07	VK_3_15	5,1	2,5	5,3	6,8	2	2,5	1500
27	VH_3_07	VK_3_20	5,3	8,8	5,3	9,4	1	2	E12
28	VH_3_07	VL_1_47	5,1	3,6	5,2	5,9	1	1	1700
29	VH_3_07	VL_1_51	5,2	4,5	5,1	4,9	1	2	1325
30	VH_3_07	VL_2_23	5,8	12,4	5,5	6,6	1	1	1600
31	VH_3_07	VL_3_1	5,3	4,1	5,4	7,3	1	1	1600
32	VH_3_11	VK_1_05	5,1	2,2	5,2	5,2	1	2	1150

Figura 21

N.º	VH	VL	Tm antes de ácido	Tm después de ácido	Cambio	Absorción Inicial	Absorción 15 min de ácido	Absorción 100 min de ácido	Absorción neutralización
33	VH_3_11	VK_1_39	79	79,5	-0,5	0,037	0,04	0,038	0,044
34	VH_3_11	VK_3_15	78,8	79	-0,2	0,04	0,042	0,041	0,041
35	VH_3_11	VL_1_40		79,1		0,037	0,051	0,049	0,044
36	VH_3_11	VL_1_47		77,1	0	0,036	0,042	0,04	0,039
37	VH_3_11	VL_1_51	76,9	77	-0,1	0,036	0,04	0,038	0,039
38	VH_3_11	VL_2_23	74,3	74,3	0	0,036	0,038	0,039	0,038
39	VH_3_15	VK_1_05	76,4	76,7	-0,3	0,037	0,047	0,043	0,039
40	VH_3_15	VK_1_06		76,2		0,038	0,04	0,04	0,036
41	VH_3_15	VK_1_09	81,7	81,9	-0,2	0,035	0,043	0,041	0,039
42	VH_3_15	VK_1_12	78,6	79,6	-1	0,036	0,038	0,037	0,037
43	VH_3_15	VK_1_16	76,4	76,7	-0,3	0,038	0,046	0,042	0,04
44	VH_3_15	VK_1_27		80,1		0,043	0,05	0,045	0,037
45	VH_3_15	VK_3_11		79,9		0,043	0,045	0,045	0,044
46	VH_3_15	VK_3_15	80,3	80,5	-0,2	0,04	0,045	0,044	0,043
47	VH_3_15	VL_1_40	80,4	80,4	0	0,036	0,046	0,04	0,037
48	VH_3_15	VL_1_47	78,1	80,3	-2,2	0,035	0,038	0,038	0,036
49	VH_3_15	VL_1_51		78,8		0,035	0,046	0,047	0,036
50	VH_3_15	VL_2_14	75,5	75,7	-0,2	0,036	0,037	0,037	0,037
51	VH_3_21	VK_1_06	74,5	75,7	-1,2	0,036	0,041	0,043	0,039
52	VH_3_21	VK_1_12		77,2		0,036	0,042	0,041	0,038
53	VH_3_21	VK_1_27	77,6	78,1	-0,5	0,036	0,041	0,047	0,045
54	VH_3_21	VL_2_11	79,7	79,8	-0,1	0,037	0,049	0,045	0,042
55	VH_3_21	VL_2_14	76,4	76,6	-0,2	0,037	0,058	0,046	0,042
56	VH_3_21	VL_2_23	76,6	77	-0,4	0,037	0,044	0,04	0,038
57	VH_3_21	VL_3_1	77,4	77,3	0,1	0,038	0,046	0,048	0,047
58	VH_3_23	VK_1_39	83,7	83,9	-0,2	0,037	0,044	0,04	0,037
59	VH_3_23	VK_3_15		85		0,039	0,045	0,05	0,047
60	VH_3_23	VK_3_20	82,3	82,3	0	0,036	0,04	0,038	0,037
61	VH_3_23	VL_2_11	82,5	82,8	-0,3	0,035	0,041	0,038	0,036
62	VH_3_23	VL_2_14	78,1	78,1	0	0,036	0,039	0,038	0,037
63	VH_3_23	VL_2_23	79	79	0	0,036	0,039	0,038	0,038
64	VH_3_23	VL_3_1	80,9	80,1	0,8	0,037	0,041	0,038	0,037



Figura 22

N.º	VH	VL	Radio inicial (nm)	% de poli-dispersidad inicial	Radio [nm] después	% de poli-dispersidad después de ácido	Tinción de partículas antes de ácido	Tinción de partículas después de ácido	Puntuación acumulada
33	VH_3_11	VK_1_39	5,2	2,9	5,5	17,2	2	2	1075
34	VH_3_11	VK_3_15	5,2	5,6	5,2	5,7	1	2	1050
35	VH_3_11	VL_1_40	5,1	2,4	5,1	5,1	1	1	1550
36	VH_3_11	VL_1_47	5,2	6	5,2	7,4	1	3,5	1550
37	VH_3_11	VL_1_51	5,1	1,9	5,1	4,8	1	1	1675
38	VH_3_11	VL_2_23	5,1	2,4	5,2	8,7	1	1	1750
39	VH_3_15	VK_1_05	5,1	3	5,2	8,3	2	2	1575
40	VH_3_15	VK_1_06	5,1	2,3	5,2	3,8	1	2	1400
41	VH_3_15	VK_1_09	7	22	5,4	14,4	2,5	2	1175
42	VH_3_15	VK_1_12	5,1	2,2	5,2	4,6	2	2	1575
43	VH_3_15	VK_1_16	5,2	3,5	5,2	3,7	3	2	1025
44	VH_3_15	VK_1_27	5,1	3	5,3	9,2	1	2	1450
45	VH_3_15	VK_3_11	5,2	5,3	5,3	13,1	2	2	1225
46	VH_3_15	VK_3_15	5,4	17,7	5,5	16,4	1	2,5	1025
47	VH_3_15	VL_1_40	5,3	11,3	5,2	7,9	3	1	1000
48	VH_3_15	VL_1_47	5,1	4	5,2	5	1	2	1150
49	VH_3_15	VL_1_51	5,6	14,1	5,2	5,9	1	2	1275
50	VH_3_15	VL_2_14	5,5	20,7	5,5	13,1	2	1	1425
51	VH_3_21	VK_1_06	5,1	2	5,2	6	1	3	1300
52	VH_3_21	VK_1_12	5,2	3,6	5,7	16,8	3	2	1500
53	VH_3_21	VK_1_27	5,2	3,3	5,3	7,6	1	2	1475
54	VH_3_21	VL_2_11	5,1	2	5,2	6	2	2	1375
55	VH_3_21	VL_2_14	5,4	5,8	5,3	5	1	2	1525
56	VH_3_21	VL_2_23	5,3	4,7	5,2	4,8	1	1	1650
57	VH_3_21	VL_3_1	8	mm	PD	mm	1	2	675
58	VH_3_23	VK_1_39	5,3	6,3	5,2	5,3	2	2	1250
59	VH_3_23	VK_3_15	5,1	2,5	5,2	6	1	2	1375
60	VH_3_23	VK_3_20	5,2	4,4	5,2	6,2	1	2,5	1300
61	VH_3_23	VL_2_11	5,2	3,6	5,3	7,5	2	2	1375
62	VH_3_23	VL_2_14	5,1	3,2	5,2	5,1	2	2	1375
63	VH_3_23	VL_2_23	5,1	2,3	5,2	6,2	1	2	1325
64	VH_3_23	VL_3_1	5,2	6	5,3	5,9	1	2	1750

Figura 23

N.º	VH	VL	Tm antes de ácido	Tm después de ácido	Cambio	Absorción inicial	Absorción 15 min de ácido	Absorción 100 min de ácido	Absorción neutralización
65	VH 3 23	VL 3 21	79	79,2	-0,2	0,036	0,041	0,038	0,037
66	VH 3 30	VK 3 15	81,1	81,2	-0,1	0,037	0,039	0,038	0,037
67	VH 3 30	VK 3 20	80,9	81,2	-0,3	0,037	0,043	0,043	0,044
68	VH 3 30	VL 2 23	80	80	0	0,036	0,041	0,039	0,037
69	VH 3 30	VL 3 1	79,7	79,6	0,1	0,039	0,046	0,049	0,054
70	VH 3 30	VL 3 21	78	78,2	-0,2	0,039	0,043	0,042	0,041
71	VH 3 53	VK 1 39	73,8	74,5	-0,7	0,042	0,047	0,045	0,044
72	VH 3 53	VK 3 15	73,6	74,1	-0,5	0,037	0,041	0,039	0,038
73	VH 3 53	VL 2 11	73,6	73,8	-0,2	0,036	0,038	0,043	0,037
74	VH 3 53	VL 2 23	69,6	69,6	0	0,036	0,042	0,039	0,037
75	VH 3 53	VL 3 1	72,6	73	-0,4	0,036	0,04	0,038	0,039
76	VH 3 74	VK 1 05	75	75,6	-0,6	0,036	0,043	0,039	0,04
77	VH 3 74	VK 1 06	77,8	77,9	-0,1	0,037	0,039	0,038	0,037
78	VH 3 74	VK 1 12	79	79,8	-0,8	0,038	0,04	0,039	0,038
79	VH 3 74	VK 1 27	78	78,3	-0,3	0,037	0,049	0,041	0,038
80	VH 3 74	VK 3 20	80,3	80	0,3	0,036	0,039	0,038	0,037
81	VH 3 74	VL 1 51	80,7	80,5	0,2	0,036	0,04	0,04	0,038
82	VH 3 74	VL 3 1	78,8	78,6	0,2	0,036	0,041	0,038	0,04
83	VH 5 51	VK 1 39	73	73,6	-0,6	0,039	0,045	0,043	0,041
84	VH 5 51	VL 1 40	77,6	77,8	-0,2	0,037	0,04	0,039	0,038
85	VH 5 51	VL 1 47	76,4	76,7	-0,3	0,036	0,041	0,038	0,037
86	VH 5 51	VL 1 51	75,7	75,6	0,1	0,035	0,04	0,04	0,04
87	VH 5 51	VL 3 1	75,7	75,5	0,2	0,036	0,047	0,042	0,04
88	VH 6 1	VK 1 06	73,6	73,3	0,3	0,037	0,038	0,037	0,037
89	VH 6 1	VK 1 09	80	80,3	-0,3	0,038	0,04	0,04	0,039
90	VH 6 1	VK 1 27	80,2	80,4	-0,2	0,037	0,037	0,039	0,038
91	VH 6 1	VK 3 15	78,1	78,1	0	0,04	0,046	0,045	0,042
92	VH 6 1	VK 3 20	77,2	77,4	-0,2	0,036	0,038	0,038	0,038
93	VH 6 1	VL 1 47	73,6	73,8	-0,2	0,046	0,081	0,078	0,094
94	VH 6 1	VL 1 51	76,6	76,6	0	0,036	0,039	0,037	0,038
95	VH 6 1	VL 3 1	69,4	69,9	-0,5	0,047	0,075	0,072	0,113

Figura 24

N°	VH	VL	Radio inicial [nm]	% de poli-dispersidad inicial	Radio [nm] después de ácido	% de poli-dispersidad después de ácido	Tinción de partículas antes de ácido	Tinción de partículas después de ácido	Puntuación acumulada
65	VH 3 23	VL 3-21	5,4	6,2	5,4	5,7	2	1	1700
66	VH 3 30	VK 3 15	5,1	2,3	5,2	5,8	2	2	1575
67	VH 3 30	VK 3 20	5,3	5,9	5,3	7,7	2	2,5	1275
68	VH 3 30	VL 2-23	5,2	2,9	5,4	9	2	1	1725
69	VH 3 30	VL 3-1	13,9	mm	12	mm	2	2	525
70	VH 3 30	VL 3-21	5,1	2,8	5,2	4,6	2	2	1600
71	VH 3 53	VK 1 39	5,2	3,6	5,4	9,3	2	2	1375
72	VH 3 53	VK 3 15	5,2	4,2	5,2	6,3	1	1	1275
73	VH 3 53	VL 2-11	5,1	2,8	5,1	5,3	2	1	1275
74	VH 3 53	VL 2-23	5,1	2,4	5,3	6,2	2	1	1250
75	VH 3 53	VL 3-1	5,4	7	6,1	26,6	3	2,5	1475
76	VH 3 74	VK 1 05	5,1	2,2	5,2	5,7	2	1	1450
77	VH 3 74	VK 1 06	5,1	2	5,2	5,4	2,5	2	1725
78	VH 3 74	VK 1 12	5,1	2,1	5,3	6,7	2	1	1650
79	VH 3 74	VK 1 27	5,2	3,6	5,3	5,8	2	2	1525
80	VH 3 74	VK 3 20	5,1	2,4	5,6	18,9	2	2	1525
81	VH 3 74	VL 1-51	5,1	4,9	5,2	6,6	2,5	2	1325
82	VH 3 74	VL 3-1	5,3	3,2	5,5	8,6	2	2	1650
83	VH 5 51	VK 1 39	5,8	19,6	5,3	8,1	1,5	2	1650
84	VH 5 51	VL 1-40	5,5	13,6	5,3	6,7	2,5	2	1625
85	VH 5 51	VL 1-47	5,3	8	5,4	11,9	2	2	1575
86	VH 5 51	VL 1-51	5,1	2,7	5,2	6,2	1	2,5	1375
87	VH 5 51	VL 3-1	5,4	8,5	5,5	11,4	1,5	3	1300
88	VH 6 1	VK 1 06	5,2	2,5	5,2	4,2	2,5	1,5	1600
89	VH 6 1	VK 1 09	5,1	2,6	5,3	5,5	3	1	1450
90	VH 6 1	VK 1 27	5,3	4,3	5,5	8,4	2	1	1450
91	VH 6 1	VK 3 15	5,6	11,7	5,3	7,9	1	2	1075
92	VH 6 1	VK 3 20	5,2	5,1	5,2	5	2	2	1450
93	VH 6 1	VL 1-47	29,4	mm	100	mm	2,5	4	150
94	VH 6 1	VL 1-51	5	3,1	5,5	15,7	1	1	1725
95	VH 6 1	VL 3-1	30	33	na	na	2	4	375

Figura 25

Kabat CDR	REGIÓN ESTRUCTURAL 1																																	HCDR1									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b						
Kabat N.º	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	V	T	F	T	S				Y	G	I	S					
VH1-18	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	V	T	F	T	S				Y	Y	M	H					
VH1-46	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	V	T	F	T	S				Y	A	I	S					
VH1-69*01	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	V	T	F	T	S				Y	W	M	S					
VH3-07	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D				Y	Y	M	S						
VH3-11	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N				Y	S	M	N						
VH3-15	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N				Y	S	M	N						
VH3-21	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S				Y	A	M	S						
VH3-23	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S				.	Y	A	M	H					
VH3-30	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	V	S	S				N	Y	M	S						
VH3-53	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	V	S	S				Y	W	M	H						
VH3-74	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S				Y	W	I	G						
VH5-51	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	S				Y	W	I	G						
VH5-01	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	A	I	S	G	D	S	V	S	S	N	S	A	A	W	N						

Kabat N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b				
VH1-18	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	AGC	GGT	GCC	GAA	GTG	AAI	AAI	CCA	GGC	GCC	AGC	GTG	AAI	GTT	AGC	TGC	AAA	GCC	AGC	GGC	TAT	ACC	TTT	ACC	AGC				TAT	GGC	ATT	AGC			
VH1-46	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	AGC	GGT	GCC	GAA	GTG	AAI	AAI	CCA	GGC	GCC	AGC	GTG	AAI	GTT	AGC	TGC	AAA	GCC	AGC	GGC	TAT	ACC	TTT	ACC	AGC				TAC	TAT	ATG	CAT			
VH1-69*01	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	AGC	GGT	GCC	GAA	GTG	AAI	AAI	CCA	GGC	AGC	AGC	GTG	AAI	GTG	AGC	TGT	AAA	GCC	AGC	GGT	GGC	ACC	TTT	AGC	AGC				TAT	GCC	ATT	AGC			
VH3-07	GAA	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGC	GGT	GGC	CTG	GTG	CAG	CCA	GGT	GGT	AGC	CTG	GGC	CTG	AGC	TGC	GCC	GCC	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	AGC				TAT	TGG	ATG	AGC			
VH3-11	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGC	GGT	GGC	CTG	GTG	AAI	CCA	GGC	GGT	AGC	CTG	GGC	CTG	AGC	TGC	GCC	GCC	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	GAT				TAC	TAC	ATG	AGC			
VH3-15	GAA	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGC	GGT	GGC	CTG	GTG	AAI	CCA	GGC	GGT	AGC	CTG	GGC	CTG	AGC	TGC	GCC	GCC	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	AGC				GCC	TGG	ATG	AGC			
VH3-21	GAA	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGC	GGT	GGC	CTG	GTG	AAI	CCA	GGC	GGT	AGC	CTG	GGC	CTG	AGC	TGC	GCC	GCC	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	AGC				TAT	AGC	ATG	AAC			
VH3-23	GAA	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGT	GGC	GGT	CTG	GTG	CAG	CCA	GGT	GGT	AGC	CTG	GGC	CTG	AGC	TGT	GCC	GCA	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	AGC				TAT	GCC	ATG	CAT			
VH3-30	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGC	GGT	GGC	GTT	GTG	CAG	CCA	GGT	GGT	AGC	CTG	GGC	CTG	AGC	TGT	GCC	GCC	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	AGC				TAT	GCC	ATG	CAT			
VH3-53	GAA	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGC	GGT	GGC	CTG	ATT	CAG	CCA	GGC	GGT	AGC	CTG	GGC	CTG	AGC	TGT	GCC	GCC	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	AGC				AAC	TAT	ATG	AGC			
VH3-74	GAA	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGC	GGT	GGC	CTG	GTG	CAG	CCA	GGT	GGT	AGC	CTG	GGC	CTG	AGC	TGT	GCC	GCC	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	AGC				TAT	TGG	ATG	CAT			
VH5-51	GAA	GTG	CAG	CTG	GTG	GAA	AGC	GGT	GGC	GAA	GTG	AAI	AAI	CCA	GGC	GGC	GAA	AGC	CTG	AAI	ATC	AGC	TGC	AAA	GCC	AGC	GGC	TTT	ACC	TTT	AGC	AGC				TAT	TGG	ATT	GGC		
VH5-01	CAG	GTG	CAG	CTG	CAA	CAG	AGC	GGC	CCA	GGC	CTG	GTT	AAI	CCA	GGC	AGC	CAG	ACC	CTG	AGC	CTG	ACC	TGC	GCC	ATT	AGC	GGC	GAT	AGC	GTT	AGC	AGC				ACG	AGC	CCC	CCC	TGG	AAC

Figura 26

Kabat CDR		REGION ESTRUCTURAL 2																			HCDR2																
		36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65			
VH1-18	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	S	A		Y	N	G	N	T	N	Y	A	Q	K	L	Q	G					
VH1-46	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	I	I	N	P		S	G	G	S	T	S	Y	A	Q	K	F	Q	G					
VH1-69*01	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	V	A	N	I	K	Q		D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G					
VH3-07	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	S	S		S	G	S	T	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G					
VH3-11	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	S	S		S	G	S	T	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G					
VH3-15	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	I	S	S	S		S	S	S	Y	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G					
VH3-21	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G		S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G					
VH3-23	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	Y		D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G					
VH3-30	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	Y	S		D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G					
VH3-53	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	Y	S		D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G					
VH3-74	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	R	I	N	S		D	G	S	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G					
VH5-51	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	I	I	Y	P		D	G	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G					
VH6-01	W	I	R	Q	S	P	S	R	G	L	E	W	L	G	R	T	Y	Y	R		S	K	W	Y	N	D	Y	A	V	S	V	K	S				

Kabat N.º	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
VH1-18	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATG	GGC	TGG	ATT	AGC	GCC		TAT	AAC	GGC	AAC	ACC	AAC	TAC	GCC	CAG	AAA	CTG	CAA	GGC	
VH1-46	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATG	GGC	ATT	ATT	AAC	CCG		AGC	GGC	GGC	AGC	ACC	AGC	TAT	GCA	CAG	AAA	TTT	CAG	GGC	
VH1-69*01	TGG	GTT	CGC	CAG	GCA	CCA	GCT	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATG	GGT	GGC	ATT	ATT	CCG		ATT	TTT	GGC	ACC	GGC	AAC	TAT	GCC	CAG	AAA	TTT	CAG	GGT	
VH3-07	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	GGC	GGC	AAC	ATC	AAA	CAG		GAT	GGC	AGC	GAG	AAA	TAC	TAT	GTG	GAT	AGC	GTG	AAA	GGC
VH3-11	TGG	ATT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	AGC	TAT	ATT	AGC	AGC		AGT	GGC	AGC	AGC	ATC	TAT	TAC	GCC	GAT	AGC	GTG	AAA	GGC	
VH3-15	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	GGC	GGC	ATC	AAA	AGC		GAT	GGC	GGC	ACC	ACC	GAT	TAT	GCC	GAT	AGC	GTG	AAA	GGC	
VH3-21	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	AGC	AGC	ATC	AGC	AGC		AGT	AGC	AGC	TAT	ATC	TAT	TAC	GCC	GAT	AGC	GTG	AAA	GGC	
VH3-23	TGG	GTT	CGC	CAG	GCA	CCA	GCA	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTG	AGC	GCC	ATT	AGC	GGC		AGC	GGT	GGC	AGC	AGC	TAT	TAT	GCC	GAT	AGC	GTG	AAA	GGT	
VH3-30	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTG	GCC	GTG	ATT	AGC	TAT		GAT	GGC	AGC	AAC	AAA	TAT	TAC	GCC	GAT	AGC	GTG	AAA	GGC	
VH3-53	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	AGC	GTG	ATC	TAT	AGC		GGC	GGC	AGC	AGC	ACC	TAT	TAT	GCC	GAT	AGC	GTG	AAA	GGC	
VH3-74	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GCC	AAA	GGC	CTG	GTT	TGG	GTT	AGC	CGC	ATT	AAC	AGC		GAC	GGC	AGC	AGC	ACC	AGC	TAT	GCC	GAT	AGC	GTG	AAA	GGC	
VH5-51	TGG	GTT	CGC	CAG	ATG	CCG	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	ATG	GGC	ATT	ATC	TAT	CCG		GGC	GAT	AGC	GAT	ACC	CGC	TAT	AGC	CCG	AGC	TTT	CAG	GGC	
VH6-01	TGG	ATT	CGC	CAG	AGC	CCG	AGC	CGC	GGT	CTG	GAA	TGG	CTG	GGC	CGC	AGC	TAT	TAT		CCG	AGC	AAA	TGG	TAC	AAC	GAT	TAC	GCC	GTT	AGC	GTG	AAA	AGC

Figura 27

Kabal CDR		REGIÓN ESTRUCTURAL 3																															
Kabal N.º	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	
VH1-18	R	V	T	M	T	T	D	T	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH1-46	R	V	T	M	T	R	D	T	S	T	S	T	V	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH1-69*01	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH3-07	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH3-11	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH3-15	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH3-21	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH3-23	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH3-30	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH3-53	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH3-74	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
VH5-51	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	
VH6-01	R	I	T	I	N	P	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	Q	L	N	S	V	T	P	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	

Kabal N.º	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94				
VH1-18	CG:C	GTG	ACC	ATG	ACC	ACC	GAT	AC:C	AGC	AC:C	AGC	ACC	GGC	TAT	ATG	GAA	CTG	CGC	TCC	CTG	CGC	AGC	AGC	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH1-46	CG:C	GTG	ACC	ATG	ACC	CGC	GAT	AC:C	AGC	AC:C	AGC	ACC	GTG	TAT	ATG	GAA	CTG	AGC	AGC	CTG	CGC	AGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH1-69*01	CG:C	GTG	ACC	ATT	ACC	GCA	GAT	GA:A	AGC	AC:C	AGC	ACC	GGC	TAT	ATG	GAA	CTG	AGC	AGC	CTG	CGC	AGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GG
VH3-07	CG:C	TTT	ACC	ATT	AGC	CGC	GAT	AA:C	GGC	AA:A	AAC	AGC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH3-11	CG:C	TTT	ACC	ATT	AGC	CGC	GAT	AA:C	GGC	AA:A	AAC	AGC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH3-15	CG:C	TTT	ACC	ATT	AGC	CGC	GAT	AA:C	GGC	AA:A	AAC	AGC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AA:A	ACC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH3-21	CG:C	TTT	ACC	ATT	AGC	CGC	GAT	AA:C	GGC	AA:A	AAC	AGC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH3-23	CG:C	TTT	ACC	ATT	AGT	CGC	GAT	AA:C	AGC	AA:A	AAC	AGC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	CGC	GCA	GAA	GAT	A	CC	GGA	G	TT	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GG
VH3-30	CG:C	TTT	ACC	ATT	AGC	CGC	GAT	AA:C	AGC	AA:A	AAC	AGC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH3-53	CG:C	TTT	ACC	ATT	AGC	CGC	GAT	AA:C	AGC	AA:A	AAC	AGC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH3-74	CG:C	TTT	ACC	ATT	AGC	CGC	GAT	AA:C	GGC	AA:A	AAC	AGC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH5-51	CA:G	GTT	ACA	ATT	AGC	GGC	GAC	AA:A	AGC	AT:C	AAC	AGC	GGC	TAT	CTG	CAA	TTG	AGC	AGC	CTG	AAA	GGC	AGC	GAT	A	CC	GGC	A	TG	TAT	TAT	T	GC	GGC	C	GT
VH6-01	CG:C	ATT	ACC	ATT	AAC	CGC	GAT	AC:C	AGC	AA:A	AAC	CAG	TTG	AGC	CTG	CAA	CTG	AAC	AGC	GTG	ACC	CGC	GAA	GAT	A	CC	GGC	G	TG	TAT	TAC	T	GC	GGC	C	GT

Figura 28

Kabat CDR		REGIÓN ESTRUCTURAL 1																											LCDR1																
Kabat N.º		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34				
VK1-05	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	.	.	.	.	.	.	S	W	L	A					
VK1-06	A	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	R	.	.	.	.	.	.	N	D	L	G					
VK1-09	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	F	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	S	.	.	.	.	.	.	S	Y	L	A					
VK1-12	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	V	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	S	.	.	.	.	.	.	S	W	L	A					
VK1-16	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	S	.	.	.	.	.	.	N	Y	L	A					
VK1-27	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	S	.	.	.	.	.	.	N	Y	L	A					
VK1-39	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	.	.	.	.	.	.	S	Y	L	N					
VK3-11	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	.	.	.	.	.	.	S	Y	L	A					
VK3-15	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	.	.	.	.	.	.	S	N	L	A					
VK3-20	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	.	.	.	.	.	.	S	Y	L	A					
Kabat N.º		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34				
VK1-05	GAT	ATT	CAG	ATG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	AGC	ACC	CTG	AGC	GCA	AGC	GTG	GGC	GAT	CGC	GTG	ACC	ATT	AC	C	TGC	GGC	GCC	AGT	CAG	AGC	ATT	AGC								AGC	TGG	CTG	GCC	
VK1-06	GCC	ATT	CAG	ATG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	AGC	AGC	CTG	AGC	GCA	AGC	GTG	GGC	GAT	CGC	GTG	ACC	ATT	AC	C	TGC	GGC	GCC	AGC	CAG	GGC	ATT	CGC									AAc	GAT	CTG	GCC
VK1-09	GAT	ATT	CAG	CTG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	AGC	TTT	CTG	AGC	GCC	AGC	GTG	GGC	GAT	CGC	GTG	ACC	ATT	AC	C	TGC	GGC	GCC	AGC	CAG	GGC	ATT	AGC									AGC	TAT	CTG	GCC
VK1-12	GAT	ATT	CAG	ATG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	AGC	AGC	GTG	AGC	GCC	AGC	GTG	GGC	GAT	CGC	GTG	ACC	ATT	AC	C	TGC	GGC	GCC	AGT	CAG	GGC	ATT	AGC									AGC	TGG	CTG	GCC
VK1-16	GAT	ATT	CAG	ATG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	AGC	AGC	CTG	AGC	GCA	AGC	GTG	GGC	GAT	CGC	GTG	ACC	ATT	AC	C	TGC	GGC	GCC	AGC	CAG	GGC	ATT	AGC									AAc	TAT	CTG	GCA
VK1-27	GAT	ATT	CAG	ATG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	AGC	AGC	CTG	AGC	GCA	AGC	GTG	GGC	GAT	CGC	GTG	ACC	ATT	AC	C	TGC	GGC	GCC	AGC	CAG	GGC	ATT	AGC									AAc	TAT	CTG	GCC
VK1-39	GAT	ATT	CAG	ATG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	AGC	AGC	CTG	AGC	GCC	AGC	GTG	GGC	GAT	CGC	GTG	ACC	ATT	AC	C	TGT	GGC	GCA	AGC	CAG	AGC	ATT	AGC									AGC	TAT	CTG	AAc
VK3-11	GAT	ATT	GTG	CTG	ACC	CA	G	AGC	CC	A	GGC	ACC	CTG	AGC	CTG	AGC	CTG	AGC	GAT	CGC	GTG	AGC	ATT	AC	C	TGT	GGC	GCA	AGC	CAG	AGC	GTG	AGC									AGC	TAT	CTG	GCC
VK3-15	GAT	ATT	GTG	ATG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	GGC	ACC	CTG	AGC	GTT	AGC	CCA	GGC	GAT	CGC	GTG	AGC	ATT	AC	C	TGT	GGC	GCC	AGT	CAG	AGC	GTT	AGC									AGC	AAc	CTG	GCC
VK3-20	GAT	ATT	GTG	CTG	ACC	CA	G	AGC	CC	G	GGC	ACC	CTG	AGC	CTG	AGC	CTG	AGC	GAT	CGC	GTG	AGC	ATT	AC	C	TGT	GGC	GCC	AGT	CAG	AGC	GTT	AGC									AGC	TAT	CTG	GCC

Figura 29

Kabat CDR	REGIÓN ESTRUCTURAL 2																LCDR2							
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56		
Kabat N.º																								
VK1-05	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S		
VK1-06	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S		
VK1-09	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	T	L	Q	S		
VK1-12	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S		
VK1-16	W	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	S	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S		
VK1-27	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	V	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	T	L	Q	S		
VK1-39	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S		
VK3-11	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T		
VK3-15	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	T	R	A	T		
VK3-20	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T		
Kabat N.º	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56		
VK1-05	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	AAA	GCC	CCG	AAA	CT	G	CTG	AT	C	TAT	GAT	GCC	AGC	AGC	CTG	GAA	AGC
VK1-06	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	AAA	GCC	CCG	AAA	CT	G	CTG	AT	C	TAT	GCC	GCC	AGC	AGC	CTG	CAA	AGC
VK1-09	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	AAA	GCC	CCG	AAA	CT	G	CTG	AT	C	TAT	GCC	GCC	AGC	AGC	CTG	CAA	AGC
VK1-12	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	AAA	GCC	CCG	AAA	CT	G	CTG	AT	C	TAT	GCC	GCC	AGC	AGC	CTG	CAA	AGC
VK1-16	TGG	TTT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	AAA	GCC	CCG	AAA	AG	C	CTG	AT	C	TAT	GCC	GCC	AGC	AGT	CTG	CAA	AGC
VK1-27	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	AAA	GTC	CCG	AAA	CT	G	CTG	AT	C	TAT	GCC	GCC	AGC	ACC	CTG	CAA	AGC
VK1-39	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGC	AAA	GCC	CCA	AAA	CT	G	CTG	AT	T	TAT	GCC	GCA	AGC	AGC	CTG	CAA	AGC
VK3-11	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGC	CAG	GCA	CCG	CGC	CT	G	CTG	AT	T	TAT	GAT	GCC	AGC	AAT	CGC	GCA	ACC
VK3-15	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGT	CAG	GCC	CCG	CGC	CT	G	CTG	AT	C	TAT	GGT	GCC	AGC	ACC	CGC	GCC	ACC
VK3-20	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	CAG	GCC	CCA	CGC	CT	G	CTG	AT	C	TAT	GGT	GCC	AGC	AGC	CGC	GCC	ACC



Figura 30

Kabat CDR		REGIÓN ESTRUCTURAL 3																																				
Kabat N.º		57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88					
VK1-05		G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C				
VK1-06		G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C				
VK1-09		G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C				
VK1-12		G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C				
VK1-16		G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C				
VK1-27		G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C				
VK1-39		G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C				
VK3-11		G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C				
VK3-15		G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	S	L	Q	S	E	D	F	A	V	Y	Y	C				
VK3-20		G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	Y	C				
Kabat N.º		57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88					
VK1-05		GGC	GTG	CCG	AGC	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAG	TTC	ACC	CTG	ACC	ATT	AGC	AGC	GTG	CAA	CCG	GAA	GAC	TTT	GCC	ACC	TAT	TAT	TGC					
VK1-06		GGC	GTG	CCA	AGT	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAT	TTC	ACC	CTG	ACC	ATT	AGC	AGT	CTG	CAA	CCG	GAA	GAC	TTT	GCC	ACC	TAT	TAT	TGC					
VK1-09		GGC	GTG	CCA	AGC	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAG	TTC	ACC	CTG	ACC	ATT	AGC	AGT	CTG	CAA	CCG	GAA	GAC	TTT	GCC	ACC	TAT	TAT	TGC					
VK1-12		GGC	GTG	CCA	AGT	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAT	TTC	ACC	CTG	ACC	ATT	AGC	AGT	CTG	CAA	CCG	GAA	GAC	TTT	GCC	ACC	TAT	TAT	TGC					
VK1-16		GGC	GTG	CCA	AGT	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAT	TTC	ACC	CTG	ACC	ATT	AGC	AGC	GTG	CAA	CCG	GAA	GAC	TTT	GCC	ACC	TAT	TAT	TGC					
VK1-27		GGT	GTG	CCG	AGC	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAT	TTC	ACC	CTG	ACC	ATT	AGT	AGC	GTG	CAA	CCG	GAA	GAC	TTT	GCC	ACC	TAT	TAT	TGC					
VK1-39		GGC	ATT	CCG	GCA	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAT	TTT	ACC	CTG	ACC	ATT	AGC	AGC	GTG	GAA	CCG	GAA	GAC	TTT	GCC	GTG	TAT	TAT	TGC					
VK3-11		GGC	ATT	CCA	GCA	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAG	TTC	ACC	CTG	ACC	ATT	AGC	AGC	GTG	CAA	AGC	GAA	GAC	TTT	GCC	GTG	TAT	TAT	TGC					
VK3-20		GGC	ATT	CCA	GAT	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	GGT	AGC	GGC	ACC	GAT	TTC	ACC	CTG	ACC	ATT	AGC	CGC	CTG	GAA	CCG	GAA	GAC	TTT	GCC	GTG	TAT	TAT	TGC					

Figura 31

Kabat CDR		REGIÓN ESTRUCTURAL 1																												LCDR1														
Kabat N°		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34			
VL1-40	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	.	V	S	G	A	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	T	G	S	S	S	S	N	I	G	A	G	.	.	Y	D	V	H				
VL1-47	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	.	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I	G	S	.	.	N	Y	V	Y					
VL1-51	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	.	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I	G	N	.	.	N	Y	V	S					
VL2-11	Q	S	A	L	T	Q	P	R	S	.	V	S	G	S	P	G	Q	S	V	T	I	S	C	T	G	T	S	S	D	V	G	G	Y	.	.	N	Y	V	S					
VL2-14	Q	S	A	L	T	Q	P	A	S	.	V	S	G	S	P	G	Q	S	I	T	I	S	C	T	G	T	S	S	D	V	G	G	Y	.	.	N	Y	V	S					
VL2-23	Q	S	A	L	T	Q	P	A	S	.	V	S	G	S	P	G	Q	S	I	T	I	S	C	T	G	T	S	S	D	V	G	S	Y	.	.	N	L	V	S					
VL3-1	S	Y	E	L	T	Q	P	P	S	.	V	S	V	S	P	G	Q	T	A	S	I	T	C	S	G	D	K	L	G	D	.	.	.	.	.	K	Y	A	Y					
VL3-21	S	Y	V	L	T	Q	P	P	S	.	V	S	V	A	P	G	K	T	A	R	I	T	C	G	G	N	N	I	G	S	.	.	.	.	.	K	S	V	H					
Kabat N°		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34			
VL1-40	CAG	ACC	GTG	GTG	ACC	CAG	CCA	CCA	AGC		GTG	AGC	GGT	GCA	CCA	GGT	CAG	CGC	GTG	ACC	ATT	AGC	TGC	ACC	GGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	ATT	GGC	GCA	GGC										
VL1-47	CAG	ACC	GTG	GTG	ACC	CAG	CCA	CCA	AGC		GCA	AGC	GGC	ACC	CCA	GGC	CAG	CGC	GTG	ACC	ATT	AGC	TGT	AGC	GGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	ATT	GGC	AGC											
VL1-51	CAG	ACC	GTG	GTG	ACC	CAG	CCA	CCA	AGC		GTT	AGC	GGC	GCA	CCA	GGC	CAG	AAA	GTG	ACC	ATT	AGC	TGT	AGC	GGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	
VL2-11	CAG	ACC	GGC	GTG	ACC	CAG	CCA	CCA	AGC		GTT	AGC	GGT	AGC	CCA	GGC	CAG	AGC	GTG	ACC	ATT	AGC	TGC	ACC	GGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	
VL2-14	CAG	ACC	GGC	GTG	ACC	CAG	CCA	CCA	AGC		GTT	AGC	GGT	AGC	CCA	GGC	CAG	AGC	ATT	ACC	ATT	AGC	TGC	ACC	GGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	
VL2-23	CAG	ACC	GGC	GTG	ACC	CAG	CCA	CCA	AGC		GTT	AGC	GGT	AGC	CCA	GGC	CAG	AGC	ATT	ACC	ATT	AGC	TGC	ACC	GGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	
VL3-1	AGC	TAT	GAA	CTG	ACC	CAG	CCA	CCA	AGC		GTT	AGC	GTT	AGC	CCA	GGC	CAG	AGC	GGC	AGC	ATT	AGC	TGT	AGC	GGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	
VL3-21	AGC	TAT	GTG	CTG	ACC	CAG	CCA	CCA	AGC		GTT	AGC	GTG	GGC	CCA	GGC	AAA	CTG	GGC	AGC	AAA	CTG	GGC	AGC	AAA	CTG	GGC	AGC	AAA	CTG	GGC	AGC	AAA	CTG	GGC	AGC	AAA	CTG	GGC	AGC	AAA	CTG	GGC	AGC

Figura 32

Kabal CDR		REGIÓN ESTRUCTURAL 2																LCDR2									
Kabat N.º	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56					
VL1-40	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	G	N	S	N	R	P	S					
VL1-47	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	R	N	N	Q	R	P	S					
VL1-51	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	N	N	K	R	P	S					
VL2-11	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	M	I	Y	D	V	S	K	R	P	S					
VL2-14	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	M	I	Y	E	V	S	N	R	P	S					
VL2-23	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	M	I	Y	E	G	S	K	R	P	S					
VL3-1	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	V	L	V	I	Y	Q	D	S	K	R	P	S					
VL3-21	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	Y	D	S	D	R	P	S					
Kabat N.º	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56					
VL1-40	TGG	TAT	CAG	CAG	CTG	CCA	GGC	AC	C	GCA	CC	G	AAA	CTG	ATT	TAT	GGC	AAC	AGC	AAT	CGC	CCA	AGC				
VL1-47	TGG	TAT	CAG	CAG	CTG	CCG	GGC	AC	C	GCC	CC	G	AAA	CTG	CTG	TAT	CGC	AAC	AAC	CAG	CGC	CCG	AGC				
VL1-51	TGG	TAT	CAG	CAG	CTG	CCG	GGC	AC	C	GCC	CC	G	AAA	CTG	CTG	TAT	GAT	AAC	AAC	AAA	CGC	CCG	AGC				
VL2-11	TGG	TAT	CAG	CAG	CAT	CCG	GGC	AA	A	GCC	CC	G	AAA	CTG	ATG	TAT	GAT	GTT	AGC	AAA	CGC	CCG	AGC				
VL2-14	TGG	TAT	CAG	CAG	CAT	CCG	GGC	AA	A	GCC	CC	G	AAA	CTG	ATG	TAT	GAA	GTT	AGC	AAC	CGC	CCG	AGC				
VL2-23	TGG	TAT	CAG	CAG	CAT	CCG	GGC	AA	A	GCC	CC	G	AAA	CTG	ATG	TAT	GAA	GCG	AGC	AAA	CGC	CCG	AGC				
VL3-1	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	CA	G	AGC	CC	G	GTG	CTG	GTT	TAT	CAG	GAT	AGC	AAA	CGC	CCG	AGC				
VL3-21	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCG	GGC	CA	G	AGC	CC	G	GTG	CTG	GTT	TAT	GAT	AGC	GAT	CGC	CCG	CCG	AGC				

Figura 33

	REGIÓN ESTRUCTURAL 3																															
Kabat N.º	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
VL1-40	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	T	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL1-47	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL1-51	G	I	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	T	L	G	I	T	G	L	Q	T	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL2-11	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL2-14	G	V	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL2-23	G	V	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL3-1	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL3-21	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	R	V	E	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C
Kabat N.º	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
VL1-40	GGT	GTG	CCG	GAT	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	AAA	AGC	GGC	ACC	AGC	GGC	AGC	CTG	GGC	ATT	ACC	GGT	CTG	CAA	GCC	GAA	GAC	GAA	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC
VL1-47	GGC	GTG	CCA	GAT	CGC	TTT	AGC	GGT	AGC	AAA	AGC	GGC	ACC	AGC	GCA	AGC	CTG	GGC	ATT	AGC	GGC	CTG	CGC	AGC	GAA	GAC	GAA	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC
VL1-51	GGC	ATC	CCG	GAT	CGC	TTT	AGC	GGT	AGC	AAA	AGC	GGC	ACC	AGC	GGC	AGC	CTG	GGC	ATT	ACC	GGC	CTG	CAA	ACC	GAA	GAC	GAA	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC
VL2-11	GGC	GTG	CCG	GAT	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	AAA	AGC	GGC	AAC	ACC	GGC	AGC	CTG	ACC	ATC	AGC	GGC	CTG	CAA	GCC	GAA	GAC	GAA	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC
VL2-14	GGC	GTT	AGC	AAT	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	AAA	AGC	GGC	AAC	ACC	GGC	AGC	CTG	ACC	ATT	AGC	GGC	CTG	CAA	GCC	GAA	GAC	GAA	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC
VL2-23	GGC	GTT	AGC	AAC	CGC	TTT	AGT	GGC	AGC	AAA	AGC	GGC	AAC	ACC	GGC	AGC	CTG	ACC	ATT	AGC	GGC	CTG	CAA	GCC	GAA	GAC	GAA	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC
VL3-1	GGC	ATT	CCA	GAA	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	AAC	AGC	GGC	AAC	ACC	GGC	AGC	CTG	ACC	ATT	AGC	GGC	ACC	CAG	GCC	GAA	GAC	GAA	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC
VL3-21	GGC	ATT	CCA	GAA	CGC	TTT	AGC	GGC	AGC	AAC	AGC	GGC	AAC	ACC	GGC	AGC	CTG	ACC	ATT	AGC	CCG	GTG	GAA	GCC	GAA	GAC	GAA	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC

Kabat	COR	REGIÓN ESTRUCTURAL 1																												HCDR1										
	N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b		
Kabat N.º	VH1-18	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S				Y	G	I	S	
	VH1-46	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S				Y	A	I	H	
	VH1-69†01	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S	S				Y	A	I	S	
	VH3-07	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	A	S	G	F	T	F	S	S				Y	W	I	S
	VH3-11	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	A	S	G	F	T	F	S	D				H	Y	I	S
	VH3-15	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	A	S	G	F	T	F	S	N				Y	W	I	S
	VH3-21	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	A	S	G	F	T	F	S	S				Y	S	I	N
	VH3-23	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	A	S	G	F	T	F	S	S				Y	A	I	S
	VH3-30	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	A	S	G	F	T	F	S	S				Y	A	I	H
	VH3-53	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	A	S	G	F	T	V	S	S				H	Y	I	S
	VH3-74	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	A	S	G	F	T	F	S	S				Y	W	I	H
	VH5-51	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	P	G	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	T	F	S	T	S				Y	W	I	S
	VH6-01	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	A	I	S	G	G	S	V	S	T	S	S	S	A	A	W	N	

Kabal N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b		
VH1-18	CAG	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	C
VH1-46	CAG	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH1-49	CAG	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH1-69/01	CAG	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH3-47	GAA	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH3-11	CAG	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH3-15	GAA	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH3-21	GAA	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH3-23	GAA	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH3-30	GAA	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH3-33	GAA	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH3-74	GAA	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH5-57	GAA	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	
VH8-01	CAG	G	G	C	A	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	A	G	G	G	C	A	G	G	G	A	G	C	

Figura 35 Vhs con una baja modificación postraduccional

Kabat CDR		REGIÓN ESTRUCTURAL 2																				HCDR2													
		36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
VH1-18	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	S	A		Y	G	G	N	T	N	Y	A	Q	K	L	O	G			
VH1-46	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	I	I	N	P		S	G	G	S	T	S	Y	A	Q	K	F	Q	G			
VH1-69*01	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	I	I	P		I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G				
VH3-07	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	N	I	K	Q		S	G	S	E	T	Y	Y	V	E	S	V	K	G			
VH3-11	W	I	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	S	S		S	G	S	T	I	Y	Y	A	E	S	V	K	G			
VH3-15	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	K	T	Y	G	G	T	T	D	Y	A	E	P	V	K	G		
VH3-21	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	I	S	S		S	S	S	G	S	T	Y	Y	A	E	S	V	K	G			
VH3-23	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G		S	G	S	T	Y	Y	A	E	S	V	K	G				
VH3-30	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	Y		S	G	S	N	K	Y	Y	A	E	S	V	K	G			
VH3-53	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	Y	S		G	G	S	T	Y	Y	A	E	S	V	K	G				
VH3-74	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	V	W	V	S	R	I	I	S		S	G	S	S	T	S	Y	A	E	S	V	K	G			
VH5-51	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	I	I	P		G	I	S	Y	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G				
VH6-01	W	I	R	Q	S	P	S	R	G	L	E	W	L	G	R	I	Y	Y	R		S	K	W	Y	N	D	Y	A	V	S	V	K	S		

Kabat N.º	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65		
VH1-18	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATG	GGC	TGG	ATT	AGC	GCC		TAT	GGC	GGC	AAC	ACC	AGC	TAC	GCC	CAG	AAA	CTG	CAA	GGC			
VH1-46	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATG	GGC	ATT	ATT	AAC	CCG		AGC	GGC	GGC	AGC	ACC	AGC	TAT	GCA	CAG	AAA	TTT	CAG	GGC			
VH1-69*01	TGG	GTT	CGC	CAG	GCA	CCA	GGT	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATG	GGT	GGC	ATT	ATT	CCG		ATT	TTT	GGC	ACC	GGC	AAC	TAT	GCC	CAG	AAA	TTT	CAG	GGT			
VH3-07	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTG	GGC	AAC	ATC	AAA	CAG		AGC	GGC	AGC	GAG	ACC	TAC	TAT	GTG	GAG	AGC	GTG	AAA	GGC			
VH3-11	TGG	ATT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	AGC	TAT	ATT	AGC	AGC		AGT	GGC	AGC	ACC	ACC	TAT	TAC	GCC	GAG	AGC	GTG	AAA	GGC			
VH3-15	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	GGC	GGC	ATC	AAA	AGC	AAA	ACC	TAT	GGC	GGC	ACC	ACC	GAT	TAT	GCC	GAG	CCA	GTG	AAA	GGC		
VH3-21	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	AGC	AGC	ATC	AGC	AGC		AGT	AGC	AGC	TAT	ACC	TAT	TAC	GCC	GAG	AGC	GTG	AAA	GGC			
VH3-23	TGG	GTG	CGC	CAA	GCA	CCA	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTG	AGC	GGC	ATT	AGC	GGC		AGC	GGT	GGC	AGC	ACC	TAT	TAT	GCC	GAG	AGC	GTG	AAA	GGT			
VH3-30	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTG	GGC	GGT	ATT	AGC	TAT		AGC	GGC	AGC	AAC	AAA	TAT	TAC	GCC	GAG	AGC	GTG	AAA	GGC			
VH3-53	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	AGC	GGT	ATC	TAT	AGC			GGC	GGC	AGC	ACC	TAT	TAT	GCC	GAG	AGC	GTG	AAA	GGC			
VH3-74	TGG	GTT	CGC	CAG	GCC	CCA	GGC	AAA	GGC	CTG	GTT	TGG	GTT	AGC	GGC	ATT	ACC	AGC		AGC	GGC	AGC	AGC	ACC	AGC	TAT	GCC	GAG	AGC	GTG	AAA	GGC			
VH5-51	TGG	GTT	CGC	CAG	ATG	CCG	GGC	AAA	GGC	CTG	GAA	TGG	ATG	GGC	ATT	ATC	TAT	CCG		GGC	ACC	AGC	TAT	ACC	CGC	TAT	AGC	CCG	AGC	TTT	CAG	GGC			
VH6-01	TGG	ATT	CGC	CAG	AGC	CCG	AGC	CGC	GGT	CTG	GAA	TGG	CTG	GGC	GGC	ATT	TAT	TAT	GGC		AGC	AAA	TGG	TAC	AAC	GAT	TAC	GCC	GTT	AGC	GTG	AAA	AGC		

Figura 36 vhs con una baja modificación postraduccional

REGIÓN ESTRUCTURAL 3																																		
Kabat N.º	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94		
VH1-18	R	V	T	M	T	T	D	T	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH1-46	R	V	T	M	T	R	D	T	S	T	S	T	V	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH1-69/01	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH3-07	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH3-11	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH3-15	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	K	T	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R	
VH3-21	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH3-23	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH3-30	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH3-53	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH3-74	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		
VH5-51	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R		
VH6-01	R	I	T	I	N	P	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	Q	L	N	S	V	T	P	E	D	T	A	V	V	Y	C	A	R		

Kabat N.º	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94							
VH1-18	CG	C	GTG	ACC	ATT	AGC	ACC	GAT	AC	C	AGC	AC	C	AGC	ACC	GGC	TAT	ATG	GAA	CTG	CGC	TCC	CTG	CGC	AGC	GAC	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH1-46	CG	C	GTG	ACC	ATT	AGC	GGG	GAT	AC	C	AGC	AC	C	AGC	ACC	GGT	TAT	ATG	GAA	CTG	AGC	AGC	CTG	CGC	AGC	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH1-69/01	CG	C	GTG	ACC	ATT	AGC	GCA	GAT	GA	A	AGC	AC	C	AGC	ACC	GGC	TAT	ATG	GAA	CTG	AGC	AGC	CTG	CGC	AGC	GAA	GAT	A	CC	GCA	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GG
VH3-07	CG	C	TTT	ACC	ATT	AGC	GGG	GAT	AA	C	GGC	AA	A	AGC	ACC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AGC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH3-11	CG	C	TTT	ACC	ATT	AGC	GGG	GAT	AA	C	GGC	AA	A	AGC	ACC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AGC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH3-15	CG	C	TTT	ACC	ATT	AGC	GGG	GAT	AA	C	GGC	AA	A	AGC	ACC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AGC	AGC	CTG	AA	ACC	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH3-21	CG	C	TTT	ACC	ATT	AGC	GGG	GAT	AA	C	GGC	AA	A	AGC	ACC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AGC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH3-23	CG	C	TTT	ACC	ATT	AGT	GGG	GAT	AA	C	AGC	AA	A	AGC	ACC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AGC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GCA	G	TT	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GG
VH3-30	CG	C	TTT	ACC	ATT	AGG	GGG	GAT	AA	C	AGC	AA	A	AGC	ACC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AGC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH3-53	CG	C	TTT	ACC	ATT	AGG	GGG	GAT	AA	C	AGC	AA	A	AGC	ACC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AGC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH3-74	CG	C	TTT	ACC	ATT	AGG	GGG	GAT	AA	C	GGC	AA	A	AGC	ACC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AGC	AGC	CTG	CGC	GGC	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH5-51	CA	G	GTT	ACA	ATT	AGG	GGC	GAT	AA	A	AGC	AT	C	AGC	ACC	GGC	TAT	CTG	CAA	TGG	AGC	AGC	CTG	AA	GGC	AGC	GAT	A	CC	GCC	A	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT
VH6-01	CG	C	ATT	ACC	ATT	AAC	GGG	GAT	AC	C	AGC	AA	A	AAC	CAG	TTG	AGC	CTG	CAA	CTG	AAC	AGC	GTG	ACC	CCG	GAA	GAT	A	CC	GCC	G	TG	TAT	TAT	T	GC	GCC	C	GT

Figura 37

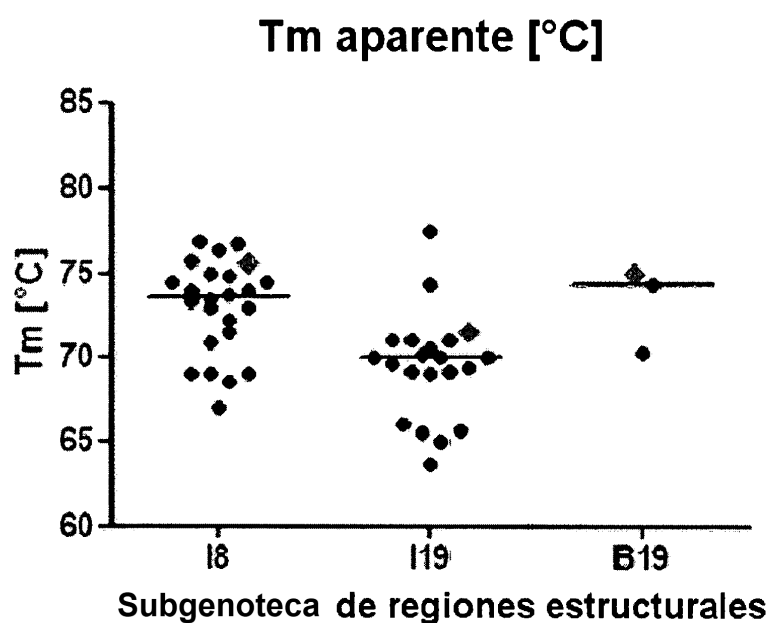
VH	VL	Diana	HCDR3		LCDR3		Fab		IgG		
			Longitud [aa]	Longitud [aa]	Tm [°C]	afinidad [nM]	pl	expresión [mg/L]	Tm [°C]	contenido monomérico por SEC [%]	
VH3-23	VK1-39	DKK3	6	8	76,8	nd	9,2	28,5	81,8	97	
VH3-23	VK1-39	DKK3	7	8	73,4	nd	9,3	40,9	81,4	100	
VH3-23	VK1-39	DKK3	8	8	72,9	nd	9,1	36,4	77,0	98	
VH3-23	VK1-39	DKK3	8	8	74,0	nd	9,4	26,0	78,8	99	
VH3-23	VK1-39	DKK3	8	8	75,0	nd	9,4	20,5	79,0	99	
VH3-23	VK1-39	DKK3	6	8	76,3	nd	9,2	17,1	83,5	98	
VH3-23	VK1-39	DKK3	9	8	75,7	nd	9,2	32,0	81,6	97	
VH3-23	VK1-39	DKK3	8	8	72,2	nd	9,4	22,9	76,0	100	
VH3-23	VL3-1	DKK3	6	8	65,6	nd	8,9	19,0	70,5	96	
VH3-23	VL3-1	DKK3	7	8	63,6	nd	8,7	36,4	68,9	100	
VH3-23	VL3-1	DKK3	7	8	70,1	nd	7,9	29,1	69,1	97	
VH3-23	VK1-39	DKK3	11	8	nd	nd	9,4	26,7	79,5	100	
VH3-23	VK1-39	DKK3	6	8	74,5	nd	9,3	30,0	82,1	97	
VH3-23	VK1-39	DKK3	6	8	73,0	nd	9,1	22,0	77,3	96	
VH3-23	VK1-39	DKK3	11	8	74,0	nd	9,2	23,6	87,0	98	
VH3-23	VL3-1	DKK3	12	9	nd	nd	8,7	25,6	74,7	98	
VH3-23	VL3-1	DKK3	7	8	71,0	nd	8,7	45,5	76,9	97	
VH3-23	VL3-1	DKK3	5	8	nd	nd	8,7	32,0	68,7	97	
VH3-23	VL3-1	DKK3	7	8	65,0	nd	8,7	28,8	70,1	90	
VH3-23	VL3-1	DKK3	7	8	70,5	nd	8,9	31,1	74,1	99	



Figura 38

VH	VL	Diana	HCDR3		LCDR3		Fab		IgG			
			Longitud [aa]	Longitud [aa]	Longitud [aa]	Tm [°C]	afinidad [nM]	pI	expresión [mg/L]	Tm [°C]	contenido por SEC [%]	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	16	8	8	75,0	nd	8,7	31,8	85,4	99	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	12	8	8	75,0	nd	9,0	36,4	82,0	100	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	15	8	8	74,8	61	8,3	50,0	85,6	99	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	13	8	8	68,4	22	9,2	17,5	77,4	99	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	11	8	8	71,4	59	8,7	32,7	77,6	99	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	15	8	8	69,0	14	9,1	28,5	74,1	100	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	13	8	8	69,0	8,4	8,9	34,5	81,4	100	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	16	8	8	73,3	20	8,9	25,3	83,2	nsp	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	19	8	8	70,8	30	9,0	26,0	86,5	100	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	17	8	8	76,7	14	8,7	35,0	78,6	99	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	14	8	8	68,9	12	8,9	32,5	87,9	100	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	19	8	8	74,5	nd	8,3	19,1	84,4	99	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	17	8	8	77,5	2,1	7,4	41,8	74,3	99	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	11	8	8	70,0	nd	7,4	36,1	76,0	98	
VH3-23	VK1-39	ErbB4/Her4	11	8	8	67,0	86	9,2	33,3	87,0	97	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	15	8	8	69,1	1,2	8,3	42,0	69,6	99	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	15	9	9	74,3	nd	7,6	26,0	69,1	98	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	12	8	8	65,9	24	8,3	42,5	70,3	97	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	18	10	10	69,0	13	8,7	31,1	72,6	99	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	11	8	8	65,5	45	7,1	38,0	75,7	99	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	12	10	10	69,9	55	7,6	29,4	79,0	97	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	14	8	8	71,0	36	7,1	24,2	68,4	99	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	15	8	8	71,0	48	8,0	26,9	73,4	99	
VH3-23	VL3-1	ErbB4/Her4	13	8	8	69,1	95	7,4	20,0	69,4	96	

Figura 39



**Leyenda:** Los puntos medios aparentes de falta de plegamiento de Fabs seleccionados determinados por fluorimetría diferencial de barrido (FDB) tal como se describe en el Ejemplo 9.1.2. Cada punto representa un único Fab. Los cuadrados indican los Fab de control descritos en el Ejemplo 9 con las CDR 3 constantes descritos en Ewert S. et al. (2004), J. Mol. Biol. p. 531ff. Las líneas indican la mediana.

I8 representa VH3-23/VK1-39

I19 representa VH3-23/VL3-1

B19 representa VH1-18/VL3-1

**Figura 40****Región estructural 4 de cadena pesada: JH4**

Kabat N.º	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
FWR4 aa	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
FWR4 nt	TGG	GGC	CAG	GGC	ACC	CTG	GTT	ACT	GTC	TCG	AGC

○

Kabat N.º	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
FWR4 aa	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
FWR4 nt	TGG	GGC	CAG	GGC	ACC	CTG	GTT	ACT	GTC	TCG	AGC

sitio de restricción XhoI CTCGAG

**Región estructural 4 de cadena ligera kappa: Jk1**

	Kabat N.º	98	99	100	101	102	103	104	105	106	106A	107	108	109
	FWR4 aa	F	G	Q	G	T	K	V	E	I		K	R	T
vector pJP_h_lgkappa	FWR4 nt	TTC	GGC	CAG	GGT	ACC	AAA	GTG	GAA	ATC		AAG	CGC	ACC
vector pJPx1	FWR4 nt	TTC	GGC	CAG	GGT	ACC	AAA	GTT	GAA	ATT		AAA	CGC	ACC
o														
vector pJPx1	FWR4 nt	TTC	GGC	CAG	GGT	ACC	AAA	GTG	GAA	ATT		AAA	CGC	ACC

sitio de restricción KpnI/Acc65I GGTACC

Leyenda: el vector pJPx1 es un vector de expresión para la expresión de Fab en E.coli  
 el vector pJP\_h\_lgkappa es un vector de expresión para la expresión de la  
 cadena ligera kappa humana en células de mamífero

**Región estructural 4 de cadena ligera kappa: Jλ2/3**

	Kabat N.º	98	99	100	101	102	103	104	105	106	106A	107	108
	FWR4 aa	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q
pJP_h_lglambda2	FWR4 nt	TTT	GGC	GGC	GGT	ACC	AAG	CTG	ACC	GTG	CTC	GGC	CAG
pJPx1	FWR4 nt	TTT	GGC	GGC	GGT	ACC	AAA	CTC	ACT	GTC	CTG	GGC	CAG
o													
vector pJPx1	FWR4 nt	TTT	GGC	GGC	GGT	ACC	AAA	CTG	ACC	GTG	CTG	GGC	CAG

sitio de restricción KpnI/Acc65I GGTACC

Leyenda: el vector pJPx1 es un vector de expresión para la expresión de Fab en E.coli  
 el vector pJP\_h\_lglambda2 es un vector de expresión para la expresión de la  
 cadena ligera lambda humana en células de mamífero

Figura 41A Cadena pesada de Fc de IgG1

IgG1		pJP_h_IgG1f																												CH1																											
		CH1 to CH3																																																							
		GGG TCG ACC AAA GGC CCC AGC GTG TTC CCT CTG GCG CCC AGC AGC AAG AGC ACC TCT GGC GGA ACA GCG GCG CTG GCG TCG CTG GTC																																																							
143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177																							
CH1																																																									
K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S																							
AAG GAC TAC TTC CCC GAG CCC GTG ACC GTG TCC TGG AAC TCT GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTT CCA GCC GTG CTC CAG AGC AGC GGC CTG TAC AGC																																																									
178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211																								
CH1																																																									
L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V																								
CTG AGC AGC GTC GTG ACC GTG CCC AGC AGC AGC CTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAC CAC AAG CCC AGC AAC ACA AAG GTG GAC AAG CCG GTG GTG																																																									
212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245																								
CH2																																																									
Bisagra																	CH2																																								
E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D																								
GAA CCC AAG AGC TGC GAC AAG ACC CAC ACC TGT CCC CCC TGC CCT GGC CCT GGC CCT GAA CTG CTG GGA GGC CCC TCC GTG TTC CTG TTC CCC CCA AAG CCT AAG GAC																																																									
246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280																							
CH2																																																									
T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V																							
ACC CTG ATG ATC ACC CGG ACC CCC GAA GTG ACC TGC GTG GTG GTG GAC GTG TCC CAC GAG GAC CCT GAA GTG AAG TTT AAT TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAA GTG																																																									

Los codones de las secuencias de ácido nucleico que se muestran han sido optimizados

Figura 41B Cadena pesada de Fc de IgG1

281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
CAC	AAC	GCC	AAG	ACC	AAG	CCC	AGA	GAG	GAA	CAG	TAC	AAC	AGC	ACC	TAC	CCG	GTG	GTG	TCC	GTG	CTG	ACC	GTG	CTG	CAC	GAG	GAC	TGG	CTG	AAC	GGC	AAA	GAG	TAC
CH2																																		
H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	O	D	W	L	N	G	K	E	Y
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	O	P	R	E	P	O	V	Y	T	L	P	S	
AAG	TGC	AAG	GTG	TCC	AAC	AAG	GCC	CTG	CCT	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	AGC	AAG	GCC	AAA	GGC	CAG	CCC	CCG	GAG	CCC	CAG	GTG	TAC	ACA	CTG	CCC	CCT	AGC
351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385
R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N
CGG	GAA	GAG	ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTG	TCC	CTG	ACC	TGC	CTC	GTG	AAG	GGC	TTC	TAC	CCC	AGC	GAC	ATT	GCC	GTG	GAA	TGG	GAG	AGC	AAC	GGC	CAG	CCC	GAG	AAC
386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	O	Q	G	N	V	F	S
AAC	TAC	AAG	ACC	ACC	CCC	CCT	GTG	CTG	GAC	AGC	GAC	GGC	TCA	TTC	TTC	CTG	TAC	AGC	AAG	CTG	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	CCG	TGG	CAG	CAG	GGC	AAC	GTG	TTC	AGC
CH3																																		
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443												
CH3																																		
C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	O	K	S	L	S	L	S	P	G	K												
TGC	TCC	GTG	ATG	CAC	GAG	GCC	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACC	CAG	AAG	TCC	CTG	AGC	CTG	AGC	CCC	GGC	AAG												

**Figura 42 Cadena pesada de Fc de Fab**

	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142					
	CH1																																	
Fab	pJpXI																																	
	CH1 - Flag-His Tag																																	
	GGC TGG ACC AAA GGC CCG AGC GTG TTT CCG CTG GCG CCG AGC AGC AAA AGC ACC AGC GGC GGC ACC GCC GCA CTG GGC TGC CTG GTG																																	
143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177
CH1																																		
K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S
AAA	GAT	TAT	TTC	CCG	GAA	CCA	GTG	ACC	GTG	AGC	TGG	AAC	AGC	GGT	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAT	ACC	TTT	CCG	GCG	GTG	CTG	CAA	AGC	AGC	GGC	CTG	TAT	AGC
178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	
CH1																																		
L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	
CTG	AGC	AGC	GTT	GTG	ACC	GTG	CCG	AGC	AGC	AGC	CTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAT	ATT	TGC	AAC	GTG	AAC	CAT	AAA	CCG	AGC	AAC	ACC	AAA	GTG	GAT	AAA	AAA	GTG	
212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234												
FLAG (M2) Tag														6xHis Tag																				
E	P	K	S	E	F	D	Y	K	D	D	D	D	K	G	A	P	H	H	H	H	H	H												
GAA	CCG	AAA	AGC	GAA	TTC	GAC	TAT	AAA	GAT	GAC	GAT	GAC	AAA	GGG	GCG	CCG	CAC	CAT	CAT	CAC	CAT	CAC												

Los codones de las secuencias de ácido nucleico que se muestran han sido optimizados

**Figura 43**

Cadena ligera kappa de Fc de IgG

IgG	pJ <sup>h</sup> Igkappa									
	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
Chappa = IgKC	GTG	GCC	GCT	CCC	TCC	GTG	TTT	ATC	TTT	CCA
	CCC	AGC	GAG	GAC	GAG	CAG	CTG	AAG	TCC	GGC
L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V
	CTG	AAC	ATC	TAC	CCC	CGC	GAG	GCC	AAA	GTG
D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S
	GAC	AGC	AAG	GAC	TCC	ACC	TAC	AGC	CTG	AGC
H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S
	CAC	CAG	GGC	CTG	TCC	AGC	CCC	GTG	ACC	AAG
C	F	N	R	G	E	C	TTC	AAC	CGG	GGC
	GAG	TGC	GGC	GAG	TGC	GGC	GAG	TGC	GGC	GAG

Cadena ligera kappa de Fc de Fab

Fab	pJ <sup>h</sup> x1									
	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
Chappa	GTG	GCC	GCA	CCG	AGC	GTG	TTT	ATC	TTT	CCG
	CCC	AGC	GAT	GAA	CAG	CTG	AAA	AGC	GGC	ACC
L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V
	CTG	AAC	AAC	TTT	TAT	CCG	CGC	GAA	GCC	AAA
D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S
	GAT	AGC	AAA	GAT	AGC	ACC	CTG	AGC	AGC	ACC
H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S
	CAT	CAG	GGC	CTG	AGC	AGC	CCA	GTG	ACC	AAA

**Figura 44**

**Cadena ligera lambda de Fc de IgG**

IgG	Clambda2																		
	ρIP <sub>h</sub>	h	l	g	l	g	l	g	l	g	l	g	l	g	l	g	l	g	l
	P	K	A	A	P	S	V	T	L	F	P	P	S	S	E	E	L	Q	A
	CCC	AAA	GCC	GCC	CCT	AGC	GTG	ACC	CTG	TTC	CCC	CCA	AGC	AGC	GAG	GAA	CTC	GAG	GCC
	ACC	AAG	GCC	GCC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC

L	I	S	D	F	Y	P	G	A	V	T	V	A	W	K	A	D	S	S	P
CTG	ATC	AGC	GAC	ITC	TAC	CCT	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC

K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q	W
AAG	CAG	AGC	AAC	AAC	AAA	TAC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC

H	E	G	S	T	V	E	K	T	V	A	P	T	E	C	S
CAC	GAG	GGC	AGC	ACC	GTG	GAA	AAG	AAC	ACC	GTG	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC

**Cadena ligera lambda de Fc de Fab**

Fab	Clambda2																		
	ρIP <sub>x1</sub>	x	1	g	l	g	l	g	l	g	l	g	l	g	l	g	l	g	l
	P	K	A	A	P	S	V	T	L	F	P	P	S	S	E	E	L	Q	A
	CCC	AAA	GCC	GCC	CCA	AGC	GTG	ACC	CTG	TTT	CCG	CCG	AGC	AGC	GAA	GAA	CTG	CAA	GCC
	ACC	AAG	GCC	GCC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC

L	I	S	D	F	Y	P	G	A	V	T	V	A	W	K	A	D	S	S	P
CTG	ATC	AGC	GAT	TTT	TAT	CCG	GGT	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC

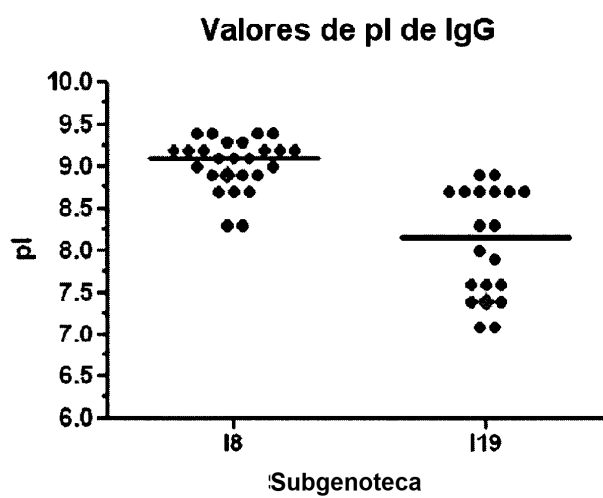
K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q	W
AAA	CAG	AGC	AAC	AAC	AAA	TAT	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC

H	E	G	S	T	V	E	K	T	V	A	P	T	E	A
CAT	GAA	GGC	AGC	ACC	GTG	GAA	AAA	ACC	GTG	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC

Los codones de las secuencias de ácido nucleico que se muestran han sido optimizados



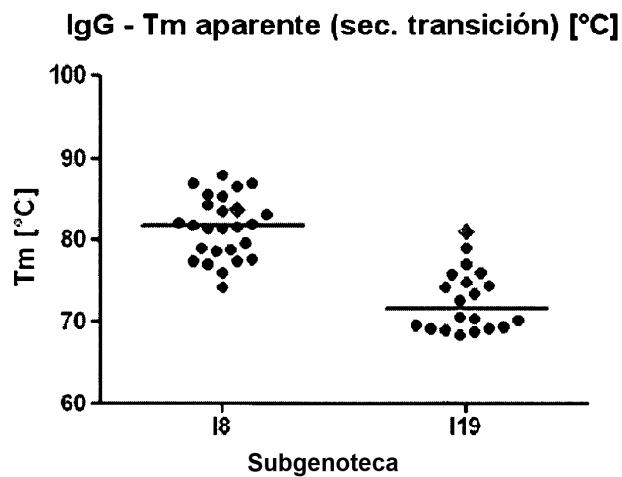
Figura 45



Leyenda: los valores de pI de IgG seleccionadas descritas en el Ejemplo 9.2.4. Cada punto representa una única IgG. Los cuadrados indican las IgG de control descritas en el Ejemplo 9 con las CDR3 constantes descritas en Ewert S. et al. (2004), J. Mol. Biol. 325, p. 531ff. Las líneas indican la mediana.

I8 representa VH3-23/VK1-39

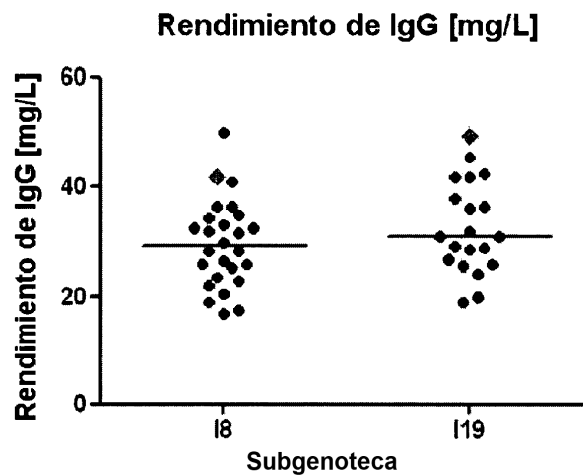
I19 representa VH3-23/VL3-1

**Figura 46**

**Leyenda:** Los puntos medios aparentes de falta de plegamiento de IgGs seleccionadas determinados por fluorimetría diferencial de barrido (FDB) tal como se describe en el Ejemplo 9.2.2. Cada punto representa una única IgG. Los cuadrados indican las IgG de control descritas en el Ejemplo 9 con las CDR3 constantes descritas en Ewert S. et al. (2004), J. Mol. Biol. 325, p 531ff. Las líneas indican la mediana.

I8 representa VH3-23/VK1-39

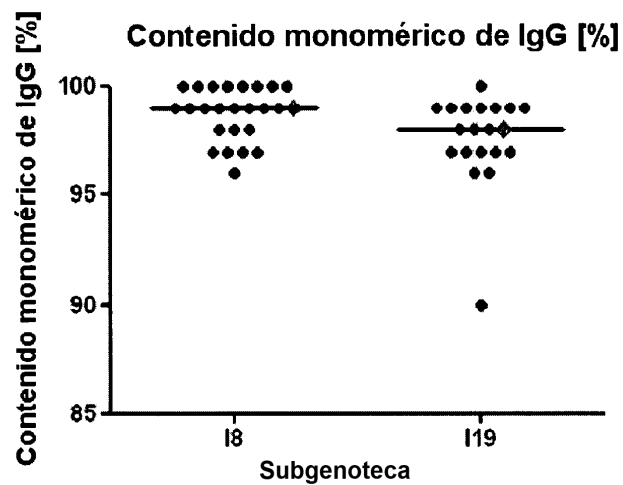
I19 representa VH3-23/VL3-1

**Figura 47**

Leyenda: Los rendimientos de expresión de IgGs seleccionadas determinados por espectrofotometría UV tal como se describe en el Ejemplo 9.2.1. Cada punto representa una única IgG. Los cuadrados indican las IgG de control descritas en el Ejemplo 9 con las CDR3 constantes descritas en Ewert S. et al. (2004), J. Mol. Biol. 325, p. 531ff. Las líneas indican la mediana.

I8 representa VH3-23/VK1-39

I19 representa VH3-23/VL3-1

**Figura 48**

Leyenda: El contenido monomérico de IgGs seleccionadas determinado por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) tal como se describe en el Ejemplo 9.2.3. Cada punto representa una única IgG. Los cuadrados indican las IgGs de control descritas en el Ejemplo 9 con las CDR3 constantes descritas en Ewert S. et al. (2004), J. Mol. Biol. 325, p. 531 ff. Las líneas indican la mediana.

I8 representa VH3-23/VK1-39

I19 representa VH3-23/VL3-1

Figura 49

Agitación			Absorción a 320 nm					
N.º	VH	VL	Inicial	después de 45 min de agitación a TA	después de 15 h de agitación a TA	después de 25 h de agitación a TA	después de 35 h de agitación a TA	después de 24 h de agitación a TA
1	VH_1_18	VK_1_39	0.041	0.049	0.054	0.056	0.059	0.1
2	VH_1_18	VK_3_11						
3	VH_1_18	VK_3_15	0.042	0.051	0.044	0.046	0.051	0.102
4	VH_1_18	VK_3_20	0.037	0.04	0.041	0.043	0.043	0.06
5	VH_1_18	VL_1-40	0.040	0.044	0.041	0.043	0.043	0.048
6	VH_1_18	VL_1-47	0.039	0.043	0.042	0.043	0.043	0.052
7	VH_1_18	VL_2-23	0.041	0.054	0.042	0.044	0.043	0.050
8	VH_1_18	VL_3-1	0.039	0.043	0.041	0.042	0.041	0.043
9	VH_1_46	VK_1_09	0.038	0.041	0.040	0.041	0.039	0.053
10	VH_1_46	VK_3_15	0.037	0.041	0.040	0.039	0.040	0.044
11	VH_1_46	VL_1-40	0.036	0.042	0.040	0.041	0.040	0.043
12	VH_1_46	VL_1-51	0.040	0.043	0.042	0.042	0.043	0.048
13	VH_1_46	VL_2-23	0.042	0.047	0.044	0.043	0.047	0.051
14	VH_1_46	VL_3-1	0.046	0.059	0.051	0.052	0.055	0.063
15	VH_1_46	VL_3-21	0.042	0.103	0.057	0.062	0.066	0.058
16	VH_1_69*01	VK_1_27						
17	VH_1_69*01	VK_3_11	0.037	0.044	0.041	0.043	0.042	0.049
18	VH_1_69*01	VL_1-40	0.040	0.042	0.041	0.043	0.040	0.045
19	VH_1_69*01	VL_1-51	0.040	0.042	0.041	0.042	0.041	0.044
20	VH_1_69*01	VL_3-1	0.042	0.068	0.060	0.069	0.076	0.113
21	VH_1_69*01	VL_3-21	0.041	0.063	0.050	0.056	0.062	0.069
22	VH_3_07	VK_1_12	0.041	0.043	0.042	0.044	0.043	0.052
23	VH_3_07	VK_1_16	0.036	0.037	0.038	0.040	0.039	0.05
24	VH_3_07	VK_1_27	0.036	0.040	0.040	0.043	0.042	0.047
25	VH_3_07	VK_1_39	0.043	0.045	0.045	0.045	0.058	0.052
26	VH_3_07	VK_3_15	0.041	0.043	0.043	0.043	0.042	0.049
27	VH_3_07	VK_3_20	0.040	0.061	0.045	0.045	0.045	0.066
28	VH_3_07	VL_1-47	0.038	0.041	0.040	0.040	0.040	0.045
29	VH_3_07	VL_1-51	0.042	0.043	0.042	0.044	0.044	0.054
30	VH_3_07	VL_2-23	0.036	0.040	0.038	0.039	0.038	0.043
31	VH_3_07	VL_3-1	0.037	0.041	0.041	0.042	0.041	0.051
32	VH_3_11	VK_1_05	0.043	0.050	0.051	0.053	0.054	0.083

Figura 50

Agitación			Tm después de estrés por agitación [°C]	DLS		Tinción de partículas	
N.º	VH	VL		Radio [nm]	% de poli-dispersidad	IgG antes del estrés clasificado de 1 a 4	IgG después del estrés clasificado de 1 a 4
1	VH_1_18	VK_1_39	79,7	5,6	21,3		4
2	VH_1_18	VK_3_11					
3	VH_1_18	VK_3_15	81,6	60	50	1,00	4,00
4	VH_1_18	VK_3_20	78	5,6	8,9		4
5	VH_1_18	VL_1_40	83,9	6	16	1	3
6	VH_1_18	VL_1_47	84,0	6,1	21	1,00	2,5
7	VH_1_18	VL_2_23	80,4	5,9	22	1,00	3,0
8	VH_1_18	VL_3_1	84,7	5,5	8,5	1,00	3,0
9	VH_1_46	VK_1_09	77,8	6	23	1,00	3,5
10	VH_1_46	VK_3_15	77,4	6	36,4	1,00	3,5
11	VH_1_46	VL_1_40	80,7	5,9	19,5	1	3,0
12	VH_1_46	VL_1_51	79,4	5,4	15,5	2,50	2,0
13	VH_1_46	VL_2_23	78,5	5,5	14,2	2,00	2,0
14	VH_1_46	VL_3_1	76,0	60	50	2,00	2,5
15	VH_1_46	VL_3_21	74,1	5,7	19,2	1,00	2,5
16	VH_1_69*01	VK_1_27					
17	VH_1_69*01	VK_3_11	77,8	5,8	22,6	1,00	3,0
18	VH_1_69*01	VL_1_40	81,6	7,3	13,2	3,00	2,5
19	VH_1_69*01	VL_1_51	78,1	5,3	4,1	1	2,5
20	VH_1_69*01	VL_3_1	79,5	60	50	1	3,5
21	VH_1_69*01	VL_3_21	76,2	6	31,6	1	3,5
22	VH_3_07	VK_1_12	78,1	5,4	22,5	2,50	3,0
23	VH_3_07	VK_1_16	75,2	5,3	4,7		2,5
24	VH_3_07	VK_1_27	80,2	6,2	50	1	2
25	VH_3_07	VK_1_39	80,0	5,3	7,1	1,00	1,5
26	VH_3_07	VK_3_15	79,2	5,9	29	2,00	2,5
27	VH_3_07	VK_3_20	78,3	60	50	1,00	3,5
28	VH_3_07	VL_1_47	78,8	5,5	19,3	1,00	2,0
29	VH_3_07	VL_1_51	79,7	60	50	1,00	3,0
30	VH_3_07	VL_2_23	81,2	5,8	18,7	1	2,5
31	VH_3_07	VL_3_1	80,9	5,7	23,8	1	3,0
32	VH_3_11	VK_1_05	74,8	60	50	1	3,5

Figura 51

Agitación			Absorción a 320 nm					
N.º	VH	VL	Inicial	después de 45 min de agitación a TA	después de 1,5 h de agitación a TA	después de 2,5 h de agitación a TA	después de 3,5 h de agitación a TA	después de 24 h de agitación a TA
33	VH_3_11	VK_1_39	0,039	0,045	0,047	0,050	0,050	0,070
34	VH_3_11	VK_3_15	0,042	0,048	0,048	0,052	0,053	0,099
35	VH_3_11	VL_1_40	0,037	0,039	0,039	0,041	0,040	0,05
36	VH_3_11	VL_1_47	0,036	0,037	0,039	0,040	0,040	0,05
37	VH_3_11	VL_1_51	0,040	0,043	0,041	0,041	0,042	0,045
38	VH_3_11	VL_2_23	0,037	0,041	0,040	0,040	0,039	0,044
39	VH_3_15	VK_1_05	0,040	0,042	0,042	0,041	0,041	0,044
40	VH_3_15	VK_1_06	0,038	0,039	0,040	0,042	0,045	0,07
41	VH_3_15	VK_1_09	0,040	0,042	0,041	0,042	0,043	0,048
42	VH_3_15	VK_1_12	0,039	0,041	0,040	0,041	0,041	0,053
43	VH_3_15	VK_1_16	0,039	0,044	0,045	0,049	0,049	0,096
44	VH_3_15	VK_1_27	0,043	0,037	0,037	0,038	0,039	0,05
45	VH_3_15	VK_3_11	0,043	0,037	0,038	0,041	0,042	0,06
46	VH_3_15	VK_3_15	0,038	0,046	0,048	0,052	0,054	0,101
47	VH_3_15	VL_1_40	0,045	0,051	0,051	0,053	0,054	0,092
48	VH_3_15	VL_1_47	0,043	0,048	0,049	0,050	0,051	0,087
49	VH_3_15	VL_1_51	0,035	0,041	0,042	0,043	0,044	0,07
50	VH_3_15	VL_2_14	0,036	0,039	0,041	0,044	0,044	0,058
51	VH_3_21	VK_1_06	0,040	0,045	0,047	0,050	0,050	0,059
52	VH_3_21	VK_1_12	0,036	0,041	0,042	0,042	0,042	0,05
53	VH_3_21	VK_1_27	0,040	0,042	0,042	0,041	0,042	0,045
54	VH_3_21	VL_2_11	0,039	0,043	0,039	0,040	0,040	0,045
55	VH_3_21	VL_2_14	0,038	0,040	0,040	0,041	0,040	0,045
56	VH_3_21	VL_2_23	0,037	0,041	0,039	0,042	0,040	0,043
57	VH_3_21	VL_3_1	0,040	0,047	0,051	0,058	0,058	0,068
58	VH_3_23	VK_1_39	0,037	0,043	0,043	0,045	0,046	0,051
59	VH_3_23	VK_3_15	0,039	0,038	0,039	0,041	0,042	0,08
60	VH_3_23	VK_3_20	0,035	0,041	0,041	0,043	0,043	0,062
61	VH_3_23	VL_2_11	0,035	0,040	0,040	0,043	0,043	0,053
62	VH_3_23	VL_2_14	0,036	0,040	0,039	0,041	0,044	0,068
63	VH_3_23	VL_2_23	0,037	0,042	0,042	0,045	0,046	0,079
64	VH_3_23	VL_3_1	0,037	0,040	0,039	0,039	0,038	0,043

Figura 52

Agitación			Tm después de estrés por agitación [°C]	DLS		Tinción de partículas	
N.º	VH	VL		Radio [nm]	% de poli-dispersidad	IgG antes del estrés clasificadas de 1 a 4	IgG después del estrés clasificadas de 1 a 4
33	VH 3-11	VK 1-39	79.2	60	50	2	3.5
34	VH 3-11	VK 3-15	79.0	60	50	1	3.5
35	VH 3-11	VL 1-40	80.5	5,1	3,1		3,0
36	VH 3-11	VL 1-47	80.5	5,1	2,7		4,0
37	VH 3-11	VL 1-51	77,1	5,4	9,9	1	2,0
38	VH 3-11	VL 2-23	74,1	5,6	22,4	1	2,5
39	VH 3-15	VK 1-05	76,0	6	24,9	2	2,0
40	VH 3-15	VK 1-06	79,0	25	50		4,0
41	VH 3-15	VK 1-09	81,4	60	50	2,5	3,5
42	VH 3-15	VK 1-12	79,5	5,6	17,2	2	3,5
43	VH 3-15	VK 1-16	76,7	60	50	3	4,0
44	VH 3-15	VK 1-27	77,4	6,8	25		3,0
45	VH 3-15	VK 3-11	25	25	50		3,0
46	VH 3-15	VK 3-15	80,3	291	23,7	1	4,0
47	VH 3-15	VL 1-40	80,7	60	50	3	3,5
48	VH 3-15	VL 1-47	77,8	60	50	1	3,5
49	VH 3-15	VL 1-51	25	25	50		2,5
50	VH 3-15	VL 2-14	75,5	60	50	2	3,0
51	VH 3-21	VK 1-06	75,5	6	23,8	1	2,5
52	VH 3-21	VK 1-12	5,7	5,7	17,9		2,0
53	VH 3-21	VK 1-27	77,6	5,5	16,9	1	2,5
54	VH 3-21	VL 2-11	79,7	6,4	31,6	2	2,5
55	VH 3-21	VL 2-14	76,4	6	24,7	1	3,0
56	VH 3-21	VL 2-23	76,9	6	25,2	1	2,5
57	VH 3-21	VL 3-1	77,4	6,4	44,4	1	3,0
58	VH 3-23	VK 1-39	83,4	60,00	50,00	2	3,0
59	VH 3-23	VK 3-15	5,9	5,9	27,6		4
60	VH 3-23	VK 3-20	82,0	60,00	50,00	1	3,5
61	VH 3-23	VL 2-11	82,5	60,00	50,00	2	3,5
62	VH 3-23	VL 2-14	78,1	60,00	50,00	2	3,5
63	VH 3-23	VL 2-23	78,8	60,00	50,00	1	3,5
64	VH 3-23	VL 3-1	80,9	5,70	16,20	1	2,0



Figura 53

Agitación			Absorción a 320 nm					
N.º	VH	VL	Inicial	después de 45 min de agitación a TA	después de 1,5 h de agitación a TA	después de 2,5 h de agitación a TA	después de 3,5 h de agitación a TA	después de 24 h de agitación a TA
65	VH_3_23	VL_3-21	0,040	0,041	0,040	0,041	0,043	0,045
66	VH_3_30	VK_3_15	0,038	0,044	0,040	0,040	0,041	0,046
67	VH_3_30	VK_3_20	0,040	0,044	0,041	0,043	0,046	0,050
68	VH_3_30	VL_2-23	0,037	0,040	0,039	0,039	0,039	0,043
69	VH_3_30	VL_3-1	0,042	0,065	0,080	0,093	0,098	0,183
70	VH_3_30	VL_3-21	0,036	0,039	0,039	0,039	0,038	0,052
71	VH_3_53	VK_1_39	0,036	0,040	0,041	0,042	0,041	0,047
72	VH_3_53	VK_3_15	0,036	0,042	0,043	0,046	0,048	0,085
73	VH_3_53	VL_2-11	0,037	0,044	0,043	0,045	0,049	0,074
74	VH_3_53	VL_2-23	0,035	0,042	0,043	0,047	0,047	0,082
75	VH_3_53	VL_3-1	0,036	0,039	0,038	0,041	0,040	0,047
76	VH_3_74	VK_1_05	0,037	0,041	0,039	0,040	0,040	0,049
77	VH_3_74	VK_1_06	0,035	0,039	0,038	0,038	0,038	0,043
78	VH_3_74	VK_1_12	0,039	0,044	0,042	0,041	0,040	0,045
79	VH_3_74	VK_1_27	0,038	0,044	0,041	0,043	0,041	0,047
80	VH_3_74	VK_3_20	0,036	0,038	0,038	0,040	0,039	0,044
81	VH_3_74	VL_1-51	0,037	0,039	0,039	0,040	0,041	0,067
82	VH_3_74	VL_3-1	0,036	0,039	0,038	0,040	0,039	0,045
83	VH_5_51	VK_1_39	0,036	0,039	0,037	0,037	0,038	0,038
84	VH_5_51	VL_1-40	0,036	0,041	0,038	0,040	0,039	0,042
85	VH_5_51	VL_1-47	0,035	0,041	0,039	0,041	0,041	0,047
86	VH_5_51	VL_1-51	0,037	0,044	0,043	0,045	0,046	0,059
87	VH_5_51	VL_3-1	0,036	0,041	0,042	0,044	0,046	0,08
88	VH_6_1	VK_1_06	0,037	0,042	0,040	0,040	0,039	0,045
89	VH_6_1	VK_1_09	0,039	0,061	0,042	0,043	0,040	0,046
90	VH_6_1	VK_1_27	0,039	0,060	0,042	0,042	0,044	0,067
91	VH_6_1	VK_3_15	0,04	0,045	0,049	0,056	0,054	0,11
92	VH_6_1	VK_3_20	0,038	0,044	0,039	0,039	0,043	0,052
93	VH_6_1	VL_1-47	0,048	0,058	0,061	0,067	0,072	0,164
94	VH_6_1	VL_1-51	0,036	0,042	0,039	0,039	0,038	0,043
95	VH_6_1	VL_3-1	0,048	0,056	0,051	0,053	0,052	0,061

Figura 54

Agitación			Tm después de estrés por agitación [°C]	DLS		Tinción de partículas	
N.º	VH	VL		Radio [nm]	% de poli-dispersidad	Ig G antes del estrés clasificados de 1 a 4	Ig G después del estrés clasificados de 1 a 4
65	VH 3 23	VL 3-21	79,0	5,30	10,60	2	2,0
66	VH 3 30	VK 3 15	80,9	5,70	21,60	2	2,5
67	VH 3 30	VK 3 20	80,9	6,70	50,00	2	3,0
68	VH 3 30	VL 2-23	80,2	5,90	23,70	2	2,5
69	VH 3 30	VL 3-1	79,5	94,00	50	2	4,0
70	VH 3 30	VL 3-21	77,8	5,70	21,60	2	3,0
71	VH 3 53	VK 1 39	74,1	5,90	24,60	2	3,0
72	VH 3 53	VK 3 15	73,8	60,00	50,00	1	3,5
73	VH 3 53	VL 2-11	73,8	60,00	50,00	2	3,0
74	VH 3 53	VL 2-23	69,6	60,00	50,00	2	3,5
75	VH 3 53	VL 3-1	73,1	5,40	12,00	3	2,5
76	VH 3 74	VK 1 05	75,5	6,10	42,20	2	2,5
77	VH 3 74	VK 1 06	77,8	5,50	18,10	2,5	2,0
78	VH 3 74	VK 1 12	79,3	5,30	12,60	2	2,0
79	VH 3 74	VK 1 27	78,1	5,50	15,70	2	2,0
80	VH 3 74	VK 3 20	79,7	60,00	50,00	2	2,5
81	VH 3 74	VL 1-51	80,7	60,00	50,00	2,5	3,0
82	VH 3 74	VL 3-1	79,0	5,50	15,60	2	2,5
83	VH 5 51	VK 1 39	73,6	5,30	10,50	1,5	3,0
84	VH 5 51	VL 1-40	77,6	5,70	23,10	2,5	2,5
85	VH 5 51	VL 1-47	76,4	5,80	21,80	2	3,0
86	VH 5 51	VL 1-51	75,7	5,60	22,70	1	2,5
87	VH 5 51	VL 3-1	77,1	7,4	24,4	2,5	2,5
88	VH 6 1	VK 1 06	73,6	5,80	17,40	2,5	2,5
89	VH 6 1	VK 1 09	79,6	5,30	10,50	3	2,5
90	VH 6 1	VK 1 27	80,0	6,30	22,60	2	3,5
91	VH 6 1	VK 3 15	78,4	8,8	26,8	2	4,0
92	VH 6 1	VK 3 20	77,1	60,00	50,00	2	3,0
93	VH 6 1	VL 1-47	73,6	60,00	44,6	2,5	3,0
94	VH 6 1	VL 1-51	76,7	5,70	22,80	1	2,5
95	VH 6 1	VL 3-1	69,6	40,00	50,00	2	2,0

Figura 55

Cálculo de la puntuación acumulada			Puntuación de los datos de absorción del tratamiento ácido				Puntuación de los datos de DSL antes y después del tratamiento ácido				Puntuación de la tinción de partículas antes y después del tratamiento ácido	
N.º	VH	VL	Inicial	15 min tratamiento ácido	100 min tratamiento ácido	después de la neutral- ización	Radio inicial [nm]	% de poli- dispersidad inicial	Radio después del trata- miento ácido [nm]	% de poli- dispersidad después del trata- miento ácido	IgG antes del estres- clasifi- cadas de 1 a 4	IgG después del estres- clasifi- cadas de 1 a 4
1	VH_1_18	VK_1_39	75	0	25	75	100	100	100	100	100	25
2	VH_1_18	VK_3_11										
3	VH_1_18	VK_3_15	100	25	75	100	100	100	100	100	100	75
4	VH_1_18	VK_3_20	100	75	75	100	100	100	100	100	100	25
5	VH_1_18	VL_1_40	100	25	100	100	100	100	100	100	100	75
6	VH_1_18	VL_1_47	100	25	75	100	100	100	100	100	100	75
7	VH_1_18	VL_2_23	100	25	75	100	100	100	100	100	100	100
8	VH_1_18	VL_3_1	100	25	75	100	100	100	100	100	100	100
9	VH_1_46	VK_1_09	100	25	25	75	100	100	100	100	100	100
10	VH_1_46	VK_3_15	100	25	75	100	100	100	100	100	100	100
11	VH_1_46	VL_1_40	100	25	75	100	100	100	100	100	100	100
12	VH_1_46	VL_1_51	100	75	100	100	100	100	100	100	100	25
13	VH_1_46	VL_2_23	100	25	75	100	100	100	100	100	100	100
14	VH_1_46	VL_3_1	75	0	0	0	50	25	25	0	75	0
15	VH_1_48	VL_3_21	100	75	75	75	50	0	50	0	100	25
16	VH_1_69*01	VK_1_27										
17	VH_1_69*01	VK_3_11	100	25	100	100	100	100	100	100	100	75
18	VH_1_69*01	VL_1_40	100	25	25	75	50	100	50	75	25	25
19	VH_1_69*01	VL_1_51	100	25	75	75	100	100	100	100	100	100
20	VH_1_69*01	VL_3_1	75	25	25	25	50	75	25	0	100	100
21	VH_1_69*01	VL_3_21	75	0	25	100	100	100	100	75	100	100
22	VH_3_07	VK_1_12	100	25	75	100	100	100	100	100	25	100
23	VH_3_07	VK_1_16	100	25	75	100	100	100	100	100	100	25
24	VH_3_07	VK_1_27	100	75	75	75	100	100	100	100	100	75
25	VH_3_07	VK_1_39	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
26	VH_3_07	VK_3_15	100	100	100	100	100	100	100	100	75	25
27	VH_3_07	VK_3_20	100	75	75	75	100	100	100	100	100	75
28	VH_3_07	VL_1_47	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
29	VH_3_07	VL_1_51	100	75	75	75	100	100	100	100	100	75
30	VH_3_07	VL_2_23	75	25	75	75	100	100	100	100	100	100
31	VH_3_07	VL_3_1	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100
32	VH_3_11	VK_1_05	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75

Figura 56

Cálculo de la puntuación acumulada			Puntuación de los datos de absorción durante y después de la agitación						Puntuación de los datos de DSL después de la agitación		Tinción de partículas	Puntuación acumulada
N.º	VH	VL	Inicial	después de 45 min de agitación a TA	después de 1.5h de agitación a TA	después de 2.5h de agitación a TA	después de 3.5h de agitación a TA	después de 24h de agitación a TA	Radio [nm]	% de dispersión	Tinción de partículas después de la agitación	
1	VH 1 18	VK 1 39	75	25	25	25	25	0	100	75	0	1050
2	VH 1 18	VK 3 11										
3	VH 1 18	VK 3 15	75	25	75	25	25	0	0	0	0	1100
4	VH 1 18	VK 3 20	100	75	75	75	75	0	100	100	0	1450
5	VH 1 18	VL 1 40	100	75	75	75	75	25	100	75	25	1525
6	VH 1 18	VL 1 47	100	75	75	75	75	25	50	75	25	1450
7	VH 1 18	VL 2 23	75	25	75	75	75	25	100	75	25	1450
8	VH 1 18	VL 3 1	100	75	75	75	75	75	100	100	25	1600
9	VH 1 46	VK 1 09	100	75	100	75	100	25	100	75	0	1475
10	VH 1 46	VK 3 15	100	75	100	100	75	75	100	25	0	1550
11	VH 1 46	VL 1 40	100	75	75	75	100	75	100	75	25	1600
12	VH 1 46	VL 1 51	100	75	75	75	75	25	100	75	75	1500
13	VH 1 46	VL 2 23	75	25	75	75	25	25	100	100	75	1450
14	VH 1 46	VL 3 1	25	25	25	25	25	0	0	0	25	400
15	VH 1 46	VL 3 21	75	0	25	0	0	25	100	75	25	875
16	VH 1 69'01	VK 1 27										
17	VH 1 69'01	VK 3 11	100	75	75	75	75	25	100	75	25	1525
18	VH 1 69'01	VL 1 40	100	75	75	75	75	25	50	100	25	1150
19	VH 1 69'01	VL 1 51	100	75	75	75	75	75	100	100	25	1575
20	VH 1 69'01	VL 3 1	75	0	0	0	0	0	0	0	0	575
21	VH 1 69'01	VL 3 21	75	0	25	25	0	0	100	25	0	1025
22	VH 3 07	VK 1 12	75	75	75	75	75	25	100	75	25	1425
23	VH 3 07	VK 1 16	100	100	100	100	100	25	100	100	25	1575
24	VH 3 07	VK 1 27	100	75	75	75	75	25	50	0	75	1450
25	VH 3 07	VK 1 39	75	25	75	25	25	25	100	100	100	1450
26	VH 3 07	VK 3 15	75	75	75	75	75	25	100	75	25	1500
27	VH 3 07	VK 3 20	100	0	75	75	25	0	0	0	0	1175
28	VH 3 07	VL 1 47	100	75	75	75	100	25	100	75	75	1700
29	VH 3 07	VL 1 51	75	75	75	75	75	25	0	0	25	1325
30	VH 3 07	VL 2 23	100	75	100	100	100	75	100	75	25	1600
31	VH 3 07	VL 3 1	100	75	75	75	75	25	100	75	25	1600
32	VH 3 11	VK 1 05	75	25	25	25	25	0	0	0	0	1150

Figura 57

Cálculo de la puntuación acumulada			Puntuación de los datos de absorción del tratamiento ácido				Puntuación de los datos de DLS antes y después del tratamiento ácido				Puntuación de la tinción de partículas antes y después del tratamiento ácido	
N.º	VH	VL	Inicial	15 min tratamiento ácido	100 min tratamiento ácido	después de la neutral- ización	Radio inicial [nm]	% de poli- dispersidad inicial	Radio después del trata- miento ácido [nm]	% de poli- dispersidad después del trata- miento ácido	IgG antes del estrés clasi- fi- cadas de 1 a 4	IgG después del estrés clasi- fi- cadas de 1 a 4
33	VH_3_11	VK_1_39	100	75	100	75	100	100	100	75	75	75
34	VH_3_11	VK_3_15	75	75	75	75	100	100	100	100	100	75
35	VH_3_11	VL_1-40	100	25	25	75	100	100	100	100	100	100
36	VH_3_11	VL_1-47	100	75	75	75	100	100	100	50	75	100
37	VH_3_11	VL_1-51	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100
38	VH_3_11	VL_2-23	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
39	VH_3_15	VK_1_05	100	25	75	100	100	100	100	100	75	75
40	VH_3_15	VK_1_06	100	75	75	100	100	100	100	100	100	75
41	VH_3_15	VK_1_09	100	75	75	100	50	100	75	100	100	75
42	VH_3_15	VK_1_12	100	100	100	100	100	100	100	100	75	75
43	VH_3_15	VK_1_16	100	25	75	75	100	100	100	100	25	75
44	VH_3_15	VK_1_27	75	25	25	100	100	100	100	100	100	75
45	VH_3_15	VK_3_11	75	25	25	75	100	100	100	100	75	75
46	VH_3_15	VK_3_15	75	25	75	75	100	75	100	75	100	25
47	VH_3_15	VL_1-40	100	25	75	100	100	100	100	100	25	100
48	VH_3_15	VL_1-47	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75
49	VH_3_15	VL_1-51	100	25	25	100	100	100	100	100	100	75
50	VH_3_15	VL_2-14	100	100	100	100	100	100	100	75	100	100
51	VH_3_21	VK_1_06	100	75	75	100	100	100	100	100	100	25
52	VH_3_21	VK_1_12	100	75	75	100	100	100	100	100	25	75
53	VH_3_21	VK_1_27	100	75	25	75	100	100	100	100	100	75
54	VH_3_21	VL_2-11	100	25	25	75	100	100	100	100	75	75
55	VH_3_21	VL_2-14	100	25	25	75	100	100	100	100	100	75
56	VH_3_21	VL_2-23	100	75	75	100	100	100	100	100	100	100
57	VH_3_21	VL_3-1	100	25	25	25	50	0	0	0	100	75
58	VH_3_23	VK_1_39	100	75	75	100	100	100	100	100	100	75
59	VH_3_23	VK_3_15	100	25	25	25	100	100	100	100	100	75
60	VH_3_23	VK_3_20	100	75	100	100	100	100	100	100	100	25
61	VH_3_23	VL_2-11	100	75	100	100	100	100	100	100	75	75
62	VH_3_23	VL_2-14	100	100	100	100	100	100	100	100	75	75
63	VH_3_23	VL_2-23	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75
64	VH_3_23	VL_3-1	100	75	100	100	100	100	100	100	100	75

Figura 58

Cálculo de la puntuación acumulada			Puntuación de los datos de absorción durante y después de la agitación					Puntuación de los datos de DLS después de la agitación		Tinción de partículas	Puntuación acumulada
N.º	VH	VL	Inicial	después de 45 min de agitación a TA	después de 15h de agitación a TA	después de 25h de agitación a TA	después de 35h de agitación a TA	Radio [nm]	% de polidispersidad	Tinción de partículas después de la agitación	Puntuación acumulada
				25	25	25	25				
33	VH 3_11	VK 1_39	100	25	25	25	25	0	0	0	1075
34	VH 3_11	VK 3_15	75	25	25	25	25	0	0	0	1050
35	VH 3_11	VL_1_40	100	100	100	75	100	100	100	25	1550
36	VH 3_11	VL_1_47	100	100	100	100	75	25	100	0	1550
37	VH 3_11	VL_1_51	100	75	75	75	75	100	100	75	1675
38	VH 3_11	VL 2-23	100	75	100	100	100	75	75	25	1750
39	VH 3_15	VK 1_05	100	75	75	75	75	100	75	75	1575
40	VH 3_15	VK 1_06	100	100	100	75	75	25	0	0	1400
41	VH 3_15	VK 1_09	75	75	75	75	75	100	75	0	1175
42	VH 3_15	VK 1_12	100	75	100	75	75	25	0	0	1025
43	VH 3_15	VK 1_16	100	75	25	25	25	50	75	25	1450
44	VH 3_15	VK 1_27	75	100	100	100	100	25	0	25	1225
45	VH 3_15	VK 3_11	75	100	100	75	75	25	75	0	1025
46	VH 3_15	VK 3_15	100	25	25	25	25	0	0	0	1000
47	VH 3_15	VL_1_40	75	25	25	25	25	0	0	0	1150
48	VH 3_15	VL_1_47	75	25	25	25	25	0	0	0	1275
49	VH 3_15	VL 1-51	100	75	75	75	75	25	0	25	1425
50	VH 3_15	VL 2-14	100	100	75	75	75	100	75	25	1300
51	VH 3_21	VK 1_06	100	25	25	25	25	100	75	25	1500
52	VH 3_21	VK 1_12	100	75	75	75	75	100	75	25	1475
53	VH 3_21	VK 1_27	100	75	75	75	75	100	75	25	1375
54	VH 3_21	VL 2-11	100	75	100	75	75	50	25	25	1650
55	VH 3_21	VL 2-14	100	100	100	75	75	100	75	25	1525
56	VH 3_21	VL 2-23	100	75	100	75	75	100	75	25	1750
57	VH 3_21	VL 3-1	100	25	25	25	25	50	0	25	675
58	VH 3_23	VK 1_39	100	75	75	25	25	0	0	25	1250
59	VH 3_23	VK 3_15	100	100	100	75	75	100	75	0	1375
60	VH 3_23	VK 3_20	100	75	75	75	75	0	0	0	1300
61	VH 3_23	VL 2-11	100	100	75	75	25	0	0	0	1375
62	VH 3_23	VL 2-14	100	75	100	75	75	0	0	0	1375
63	VH 3_23	VL 2-23	100	75	75	75	25	0	0	0	1325
64	VH 3_23	VL 3-1	100	75	100	100	100	100	75	75	1750

Figura 59

Cálculo de la puntuación acumulada			Puntuación de los datos de absorción del tratamiento ácido				Puntuación de los datos de DLS antes y después del tratamiento ácido				Puntuación de la tinción de partículas antes y después del tratamiento ácido	
N.º	VH	VL	Inicial	15 min tratamiento ácido	100 min tratamiento ácido	después de la neutral- ización	Radio inicial [nm]	% de poli- dispersidad inicial	Radio después del trata- miento ácido [nm]	% de poli- dispersidad después del trata- miento ácido	IgG antes del estrés clasi- ficadas de 1 a 4	IgG después del estrés clasi- ficadas de 1 a 4
65	VH 3-23	VL 3-21	100	75	100	100	100	100	100	100	75	100
66	VH 3-30	VK 3-15	100	100	100	100	100	100	100	100	75	75
67	VH 3-30	VK 3-20	100	75	75	75	100	100	100	100	100	25
68	VH 3-30	VL 2-23	100	75	100	100	100	100	100	100	75	100
69	VH 3-30	VL 3-1	100	25	25	25	50	0	50	0	75	75
70	VH 3-30	VL 3-21	100	75	75	75	100	100	100	100	75	75
71	VH 3-53	VK 1-39	75	25	25	25	100	100	100	100	75	75
72	VH 3-53	VK 3-15	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100
73	VH 3-53	VL 2-11	100	100	75	75	100	100	100	100	75	100
74	VH 3-53	VL 2-23	100	75	100	100	100	100	100	100	75	100
75	VH 3-53	VL 3-1	100	75	100	100	100	100	100	50	75	25
76	VH 3-74	VK 1-05	100	75	75	100	100	100	100	100	75	100
77	VH 3-74	VK 1-06	100	100	100	100	100	100	100	100	25	75
78	VH 3-74	VK 1-12	100	75	100	100	100	100	100	100	75	100
79	VH 3-74	VK 1-27	100	25	75	75	100	100	100	100	75	75
80	VH 3-74	VK 3-20	100	100	100	100	100	100	100	100	75	75
81	VH 3-74	VL 1-51	100	75	75	75	100	100	100	100	25	75
82	VH 3-74	VL 3-1	100	75	100	100	100	100	100	100	75	75
83	VH 5-51	VK 1-39	100	25	75	75	100	100	100	75	100	75
84	VH 5-51	VL 1-40	100	75	100	100	100	100	100	100	25	75
85	VH 5-51	VL 1-47	100	75	100	100	100	100	100	100	75	75
86	VH 5-51	VL 1-51	100	75	75	75	100	100	100	100	100	25
87	VH 5-51	VL 3-1	100	25	75	75	100	100	100	100	100	25
88	VH 6-1	VK 1-06	100	100	100	100	100	100	100	100	25	100
89	VH 6-1	VK 1-09	100	75	75	75	100	100	100	100	25	100
90	VH 6-1	VK 1-27	100	100	100	100	100	100	100	100	75	100
91	VH 6-1	VK 3-15	75	25	25	25	100	100	100	100	100	75
92	VH 6-1	VK 3-20	100	100	100	100	100	100	100	100	75	75
93	VH 6-1	VL 1-47	25	0	0	0	25	0	0	0	25	0
94	VH 6-1	VL 1-51	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
95	VH 6-1	VL 3-1	25	0	0	0	0	25	25	0	75	0

Figura 60

Cálculo de la puntuación acumulada			Puntuación de los datos de absorción durante y después de la agitación						Puntuación de los datos de la agitación		Tinción de partículas	Puntuación acumulada	
N.º	VH	VL	Inicial	después de 45 min de agitación a TA	después de 15h de agitación a TA	después de 2.5h de agitación a TA	después de 35h de agitación a TA	después de 24h de agitación a TA	Radio [nm]	% de polidispersidad	Tinción de partículas después de la agitación	Puntuación acumulada	
65	VH_3_23	VL_3_21	100	75	75	75	75	75	100	100	75	1700	
66	VH_3_30	VK_3_15	100	75	75	75	75	25	100	75	25	1575	
67	VH_3_30	VK_3_20	100	75	75	75	25	25	50	0	25	1275	
68	VH_3_30	VL_2_23	100	100	100	100	100	75	100	75	25	1725	
69	VH_3_30	VL_3_1	75	0	0	0	0	0	25	0	0	525	
70	VH_3_30	VL_3_21	100	100	100	100	100	25	100	75	25	1600	
71	VH_3_53	VK_1_39	100	75	75	75	75	25	100	75	25	1375	
72	VH_3_53	VK_3_15	100	75	75	25	25	0	0	0	0	1275	
73	VH_3_53	VL_2_11	100	75	75	25	25	0	0	0	25	1275	
74	VH_3_53	VL_2_23	100	75	75	25	25	0	0	0	0	1250	
75	VH_3_53	VL_3_1	100	100	100	75	100	25	100	100	25	1475	
76	VH_3_74	VK_1_05	100	75	100	75	75	25	50	0	25	1450	
77	VH_3_74	VK_1_06	100	100	100	100	100	75	100	75	75	1725	
78	VH_3_74	VK_1_12	100	75	75	75	75	25	100	100	75	1650	
79	VH_3_74	VK_1_27	100	75	75	75	75	75	100	75	75	1525	
80	VH_3_74	VK_3_20	100	100	100	100	100	75	0	0	25	1525	
81	VH_3_74	VL_1_51	100	100	100	75	75	0	0	0	25	1325	
82	VH_3_74	VL_3_1	100	100	100	75	100	75	100	75	25	1650	
83	VH_5_51	VK_1_39	100	100	100	100	100	100	100	100	25	1650	
84	VH_5_51	VL_1_40	100	75	100	100	100	75	100	75	25	1625	
85	VH_5_51	VL_1_47	100	75	100	75	75	25	100	75	25	1575	
86	VH_5_51	VL_1_51	100	75	75	75	25	25	100	75	25	1375	
87	VH_5_51	VL_3_1	100	75	75	75	25	25	50	75	25	1300	
88	VH_6_1	VK_1_06	100	75	100	75	100	25	100	75	25	1600	
89	VH_6_1	VK_1_09	100	0	75	75	75	25	100	100	25	1450	
90	VH_6_1	VK_1_27	100	25	75	75	75	75	0	50	75	0	1450
91	VH_6_1	VK_3_15	75	25	25	25	25	0	50	75	0	1075	
92	VH_6_1	VK_3_20	100	75	100	100	75	25	0	0	25	1450	
93	VH_6_1	VL_1_47	25	25	0	0	0	0	0	0	25	150	
94	VH_6_1	VL_1_51	100	75	100	100	100	75	100	75	25	1725	
95	VH_6_1	VL_3_1	25	25	25	25	25	0	25	0	75	375	



Figura 61 A

Composición de las parejas proteicas de la línea germinal	Diana	Inmovilización de antígeno	Bloqueo	# de clones escrutados	Acieros de ELISA para 368			# de clones secuenciados	# de anti- cuerpos únicos
					> 10X Fondo	5-10X Fondo	0		
VH3-23 K1-39	FZD4-Fc	Captura con Fc	Lacta en polvo y bloqueo de Fc	368	149	0	85	19	
VH1-69 L1-51									
VH3-07 L1-51	GFP	perlas de epoxi M450	Chemiblocker	368	132	24	34	21	
VH3-15 L1-51									
VH5-51 L1-51									
VH6-1 L1-51									
VH3-23 K1-39	GFP	perlas de epoxi M450	Chemiblocker	368	6	11	10	7	
VH3-74 K1-06									
VH1-69 L1-51									
VH3-07 L1-51	HER4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + 50 µg/mL de proteína de fusión Fc irrelevante	368	223	31	25	21	
VH3-15 L1-51									
VH5-51 L1-51									
VH6-1 L1-51									
VH3-23 K1-39	HER4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + 50 µg/mL de proteína de fusión Fc irrelevante	368	69	38	27	8	
VH3-74 K1-06									
VH1-69 L1-51									
VH3-07 L1-51	FZD4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + 50 µg/mL de proteína de fusión Fc irrelevante	368	64	19	24	15	
VH3-15 L1-51									
VH5-51 L1-51									
VH6-1 L1-51									
VH3-23 K1-39	FZD4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + 50 µg/mL de proteína de fusión Fc irrelevante	368	97	44	42	28	
VH3-74 K1-06									
VH1-18 VK3-20									
VH3-07 VK1-12	GFP	perlas de epoxi M450	Chemiblocker	368	5	2	7	4	
VH3-15 VK1-05									
VH3-15 VK1-06									
VH3-15 VK1-12									
VH3-21 VK1-12									

Figura 61 B

Composición de las parejas proteicas de la línea germinal	Diana	Inmovilización de antígeno	Bloqueo	# de clones escrutados	Acertijos de ELISA para 368			# de anti-cuerpos únicos
					> 10X Fondo	5-10X Fondo	# de clones secuencias	
VH3-23 VL3-1	GFP	perlas de epoxi M450	Chemiblocker	368	10	16	26	17
VH1-18 VK3-20 VH3-07 VK1-12 VH3-15 VK1-05 VH3-15 VK1-06 VH3-15 VK1-12 VH3-21 VK1-12	HER4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + proteína de fusión Fc irrelevante	368	168	14	61	20
VH1-18 VK3-20 VH3-07 VK1-12 VH3-15 VK1-05 VH3-15 VK1-06 VH3-15 VK1-12 VH3-21 VK1-12	FZD4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + proteína de fusión Fc irrelevante	368	161	30	93	27
VH3-11 VL1-47 VH3-23 VL2-23 VH3-53 VL2-11 VH5-51 VL1-40 VH3-23 VL3-1	GFP	perlas de epoxi M450	Chemiblocker	368	36	16	52	43
VH1-46 VK3-15 VH3-07 VK1-27	GFP	perlas de epoxi M450	Chemiblocker	368	36	9	36	14
VH3-11 VL1-47 VH3-23 VL2-23 VH3-53 VL2-11 VH5-51 VL1-40 VH3-23 VL3-1	HER4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + proteína de fusión Fc irrelevante	368	141	38	96	26
VH1-46 VK3-15 VH3-07 VK1-27	HER4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + proteína de fusión Fc irrelevante	368	12	98	40	1
VH3-11 VL1-47 VH3-23 VL2-23 VH3-53 VL2-11 VH5-51 VL1-40 VH3-23 VL3-1	FZD4-Fc	perlas de epoxi M450	Chemiblocker + 50 µg/mL de proteína de fusión Fc irrelevante	368	77	21	88	27

**Figura 61 C**

Composición de las parejas proteicas de la línea germinal	Diana	Inmovilización de antígeno	Bloqueo	# de clones escrutados	Aciertos de ELISA para 368		# de clones secuencias	# de anti-cuerpos únicos
					> 10X Fondo	5-10X Fondo		
VH5-51 VK1-39 VH3-74 VK1-12 VH3-15 VK3-11 VH3-74 VK3-20 VH6-1 VK3-20 VH1-18 VK3-20	HER4-Fc	perlas de epoxi M450	Chem iblocker + proteina de fusión Fc irrelevante	368	12	5	11	8
VH5-51 VK1-39 VH3-74 VK1-12 VH3-15 VK3-11 VH3-74 VK3-20 VH6-1 VK3-20 VH1-18 VK3-20	FZD4-Fc	perlas de epoxi M450	Chem iblocker + proteina de fusión Fc irrelevante	368	15	1	9	8
VH3-23 VK3-15 VH3-53 VK3-15 VH3-07 VK3-15 VH6-01 VK1-09 VH3-15 VK1-27 VH3-74 VK1-05 VH3-07 VK1-12	HER4-Fc	perlas de epoxi M450	Chem iblocker + proteina de fusión Fc irrelevante	368	5	2	6	5

**Figura 61D**

Composición de las parejas proteicas de la línea germinal	Diana	Inmovilización de antígeno	Bloqueo	# de clones escrutados	Acieritos de ELISA para 368			# de anti- cuerpos únicos
					> 10X Fondo	5-10X Fondo	# de clones secuencias	
VH3-11 VL1-40 VH3-07 VL1-47 VH1-46 VL1-51 VH3-11 VL1-51 VH3-11 VL2-23 VH5-51 VL1-51	GFP	perlas epoxi M450	Chemiblocker	368	14	1	6	4
VH3-11 VL1-40 VH3-07 VL1-47 VH1-46 VL1-51 VH3-11 VL1-51 VH3-11 VL2-23 VH5-51 VL1-51	HER4-Fc	perlas epoxi M450	Chemiblocker + proteína de fusión Fc irrelevante	368	13	3	8	4
VH3-11 VL1-40 VH3-07 VL1-47 VH1-46 VL1-51 VH3-11 VL1-51 VH3-11 VL2-23 VH5-51 VL1-51	FZD4-Fc	perlas epoxi M450	Chemiblocker + proteína de fusión Fc irrelevante	368	4	0	2	2

Figura 62A

VH	VL	Diana	Longitud HCDR3 Kabat [aa]	Longitud LCDR3 SAS [aa]	pI	expresión [mg/L]	T <sub>m</sub> [°C]	cantidad monomérica por SEC [%]
VH3-23	VK1-39	rhErbB4/HER4-Fc	10	8	8,7	27,3	81,8	99
VH3-23	VK1-39	rhErbB4/HER4-Fc	8	8	9,4	3,5	79,1	na
VH3-23	VK1-39	rhErbB4/HER4-Fc	12	8	9,2	22,0	77,8	99
VH3-23	VK1-39	rhErbB4/HER4-Fc	14	8	8,7	26,0	86,1	99
VH3-23	VK1-39	rhErbB4/HER4-Fc	10	8	9,3	13,8	81,2	98
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	9	9	9,2	37,6	75,5	87
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	8	10	8,9	36,0	69,8	97
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	9	11	9,1	26,4	75,0	89
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	9	11	8,6	33,5	68,9	95
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	9	10	9,1	18,0	75,0	92
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	11	8	9,2	15,4	86,3	96
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	10	8	9,1	18,9	78,5	100
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	11	8	9,1	1,0	79,6	na
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	8	8	9,1	13,8	81,9	99
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	10	8	9,2	21,6	81,8	100
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	10	8	8,9	14,7	78,1	100
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	10	8	9,1	17,6	78,9	100
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	10	8	9,2	11,4	82,1	100
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	10	8	9,2	1,6	76,7	na
VH3-23	VK1-39	rhFZD4-Fc	10	8	9,2	7,0	83,7	na
VH3-23	VK1-39	eGFP	10	8	8,7	17,2	81,8	99
VH3-23	VK1-39	eGFP	10	8	9,2	13,2	81,8	100
VH3-23	VK1-39	eGFP	14	8	9,0	17,5	81,0	97
VH5-51	VL1-51	eGFP	15	11	9,3	38,2	67,0	98
VH5-51	VL1-51	eGFP	15	11	9,2	34,0	67,3	98
VH5-51	VL1-51	eGFP	16	11	9,0	30,5	76,7	93
VH5-51	VL1-51	eGFP	17	11	9,0	21,8	63,0	95
VH5-51	VL1-51	eGFP	15	12	9,2	9,0	71,7	na

Figura 62B

VH	VL	Diana	Longitud HCDR3 Kabat [aa]	Longitud LCDR3 SAS [aa]	pI	expresión [mg/L]	T <sub>m</sub> [°C]	cantidad monomérica por SEC [%]
VH1-46	VK3-15	eGFP	12	9	9,3	10,5	68,9	96
VH1-46	VK3-15	eGFP	11	9	9,4	4	75,2	100
VH1-46	VK3-15	eGFP	11	9	9,4	10,5	79,4	74/78
VH3-15	VK1-05	rhErbB4/HER4-Fc	10	8	9,2	48,3	80,4	100
VH3-21	VK1-12	rhErbB4/HER4-Fc	14	8	9,4	30,5	73,6	100
VH3-21	VK1-12	rhErbB4/HER4-Fc	15	8	9,4	13,8	73,6	96/95
VH3-21	VK1-12	rhErbB4/HER4-Fc	11	8	9,2	20	nsp	100
VH5-51	VL1-40	rhErbB4/HER4-Fc	10	10	9	27,6	66	91/93
VH5-51	VL1-40	rhErbB4/HER4-Fc	10	10	8,7	35,2	73,2	94/95
VH3-21	VK1-12	rhFZD4-Fc	12	8	9,4	31,3	79,5	99
VH3-21	VK1-12	rhFZD4-Fc	10	8	9,1	21,9	76,2	100
VH3-23	VL3-1	rhFZD4-Fc	12	10	8,9	4,4	nsp	85
VH3-23	VL3-1	rhFZD4-Fc	13	10	8,9	14,7	66,2	85/91
VH3-23	VL3-1	rhFZD4-Fc	13	10	8,7	40,8	75,5	93/97
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	7	11	8,9	20,7	69,2	93/93
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	9	11	9,1	28,6	69,6	91/91
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	9	11	9,1	33	76,1	95/96
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	10	11	8,9	34,5	74	88/90

Figura 62C

VH	VL	Diana	Longitud HCDR3 Kabat [aa]	Longitud LCDR3 SAS [aa]	pI	expresión [mg/L]	T <sub>m</sub> [°C]	cantidad monomérica por SEC [%]
VH1-69	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	9	10	8,9	29,9	76,2	88/90
VH1-69-bajo	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	7	11	9,1	34	71	98
VH1-69-bajo	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	10	10	8,9	61,8	77,5	95
VH1-69-bajo	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	9	10	9,1	40	79	93
VH1-69-bajo	VL1-51	rhErbB4/HER4-Fc	7	10	9,2	37,8	78,9	97/98
VH3-23	VL1-47	eGFP	9	11	9,4	46,1	67,8	100
VH3-23	VL1-47	eGFP	9	9	9,5	39,8	66,5	100
VH3-23	VL1-47	eGFP	9	11	9,4	4,1	70,4	97
VH3-23	VL1-47	eGFP	9	11	9,5	52,2	68,5	94/96
VH3-53	VL2-11	rhErbB4/HER4-Fc	6	9	9,2	12,7	75,1	100
VH3-53	VL2-11	rhErbB4/HER4-Fc	14	10	9,4	37,8	73,6	96
VH3-53	VL2-11	rhErbB4/HER4-Fc	7	10	9,2	48,3	75,6	98/99
VH3-07	VK1-27	rhErbB4/HER4-Fc	10	8	9	25,5	82,9	100
VH3-53	VL2-11	rhFZD4-Fc	11	9	9,1	56	70,7	98

VH1-69-bajo se refiere a las VHs con PTM baja que se muestran en las Figuras