(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 988 673**

(51) Int. Cl.:

***C07K 16/00*** (2006.01)

***C07K 16/18*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2018 PCT/EP2018/066563**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018 WO18234438**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2018 E 18731127 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3642227**

(54) Título: **Bibliotecas de anticuerpos caninos**

(30) Prioridad:

**22.06.2017 EP 17177322**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**21.11.2024**

(73) Titular/es:

**ADIVO GMBH (100.0%)**
**Am Klopferspitz 19**
**82152 Planegg, DE**

(72) Inventor/es:

**TILLER, THOMAS;**
**WALDHUBER, MARKUS;**
**STROHNER, RALF;**
**LADETZKI-BAEHS, KATHRIN y**
**PRASSLER, JOSEF**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

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

Bibliotecas de anticuerpos caninos

### Campo de la invención

La presente invención se refiere y proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que es adecuada para la selección de anticuerpos totalmente caninos. La invención también se refiere a secuencias sintéticas de ácido nucleico que codifican anticuerpos caninos individuales o colecciones de anticuerpos caninos, es decir, secuencias de ácido nucleico que codifican bibliotecas de anticuerpos caninos. Se proporcionan procedimientos para generar y utilizar tales bibliotecas. En particular, la invención se refiere a la preparación de una biblioteca de anticuerpos totalmente caninos mediante el uso de secuencias sintéticas de línea germinal para generar una biblioteca de anticuerpos totalmente caninos con propiedades biofísicas específicas.

### Antecedentes de la invención

Las inmunoglobulinas, tales como los anticuerpos, son de interés continuo y creciente para la industria farmacéutica. Desde el año 2000, el mercado terapéutico de los anticuerpos monoclonales ha crecido exponencialmente y, en 2007, ocho de los 20 fármacos biotecnológicos más vendidos en EE.UU. eran anticuerpos monoclonales terapéuticos, cada uno con unas ventas anuales mundiales de más de 5.000 millones de dólares. Los anticuerpos terapéuticos mejoran el tratamiento de muchas enfermedades y mejoran cada vez más la calidad de vida de los pacientes, incluso con las enfermedades más graves y difíciles.

Los animales de compañía, tales como los perros, desarrollan enfermedades similares a las humanas subyacentes a mecanismos y trastornos biológicos similares o incluso iguales. Por ejemplo, el linfoma es la neoplasia más frecuente del sistema hemolinfático canino. Representa aproximadamente el 4,5 % de todas las neoplasias caninas y el 15 % de todas las neoplasias malignas. El linfoma canino (CL) suele ser rápidamente letal, provocando la muerte entre uno y tres meses después del diagnóstico (Squire et al, 1973; Steven E. Crow, 2008). Además, se calcula que uno de cada cinco perros adultos en EE.UU. tiene artritis y los perros se han utilizado como modelos de enfermedades articulares humanas, por ejemplo para la artrosis, la rotura del ligamento cruzado anterior y las lesiones meniscales.

Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales terapéuticos no sólo constituyen una clase de fármacos muy prometedora para el tratamiento de seres humanos, sino también para el tratamiento de perros.

Ya existen intentos de utilizar anticuerpos para el tratamiento de perros. Incluso antes de que la U.S. Food and Drug Administration's (FDA) aprobara el primer anticuerpo monoclonal para el tratamiento del cáncer humano, en 1992 the United States Department of Agriculture (USDA) había aprobado el anticuerpo monoclonal MAb 231 para su uso en perros con linfoma. El MAb 231 es un anticuerpo monoclonal derivado de murinos que se generó utilizando la tecnología de hibridoma desarrollada por Kohler and Milstein en 1975 y se une específicamente a la línea celular de linfoma canino 17-71 (véase, por ejemplo: el documento US5169775A). Se demostró que el MAb 231 se unía a las células tumorales y no a las normales, y que pertenecía al isotipo murino IgG2a, terapéuticamente deseable y mediador de la citotoxicidad celular.

Mientras tanto, se utilizan procedimientos para "caninizar" anticuerpos y, por lo tanto, imitar los anticuerpos caninos. Por ejemplo, Gearing et al. (BMC Veterinary Research 2013, 9:226) divulga la generación de un anticuerpo monoclonal anti-NGF "totalmente caninizado" mediante el uso de un algoritmo que se basa en secuencias de inmunoglobulina canina expresadas para convertir un anticuerpo monoclonal anti-NGF de rata existente en un mAb anti-NGF caninizado recombinante.

Oksana Akhova et al, 3 de noviembre de 2015 (http://usask.technologypublisher.com/files/sites/ncs-canine-synthetic-antibody-library.pdf), divulga una biblioteca sintética de anticuerpos caninos. Dicha biblioteca de anticuerpos se sintetizó en un sistema de fagos de anticuerpos.

Biolabs Creative, 14 de enero de 2016 (https://www.pdf-archive.com/2016/01/14/what-you-need-to-know-about-monoclonal-canine-dog-antibody/.pdf), y Olivia Ray, 2 de febrero de 2016 (https://articles.abiloqic.com/134652/unique-monoclonal-canine-doq-antibody.html), también divulgan bibliotecas sintéticas de anticuerpos caninos.

Según el conocimiento de los inventores, no se ha divulgado previamente ni una biblioteca de anticuerpos caninos totalmente sintética ni ninguna otra biblioteca de anticuerpos caninos fiable con una composición VH/VL predefinida y diversa. Dentro de la presente invención, el análisis racional de las secuencias naturales de anticuerpos caninos y el sofisticado diseño de las bibliotecas, condujeron a las primeras bibliotecas de anticuerpos caninos totalmente sintéticas que son ampliamente útiles para la investigación biomédica. Los miembros de la biblioteca también se seleccionaron por sus propiedades ventajosas, tales como un alto contenido monomérico y una elevada estabilidad térmica.

En cuanto a los procedimientos de cribado de las bibliotecas sintéticas de anticuerpos caninos, se puede utilizar la visualización en fagos, E. coli, levadura o similares. En la visualización de fagos preferida, por ejemplo, los anticuerpos se presentan como un polipéptido de fusión en una proteína de superficie del bacteriófago. Las partículas visualizadas de fago con anticuerpos se ponen en contacto con una molécula diana de interés (por ejemplo, inmovilizada en una

fase sólida (por ejemplo, placa de microtitulación, microesfera magnética, etc.) o en solución), para realizar así una selección por afinidad. Se seleccionan los fagos que expresan anticuerpos con afinidad por la molécula diana y se eliminan los fagos con anticuerpos que no se unen a la molécula diana durante la ronda de selección, lo que se conoce como "(bio)-paneo". En la visualización de fagos, el anticuerpo presentado en los fagos seleccionados se corresponde uno a uno con el gen que lo codifica y, por lo tanto, el anticuerpo de interés puede identificarse fácilmente. Además, el gen que codifica el anticuerpo puede amplificarse fácilmente, por lo tanto la visualización de fagos se utiliza ampliamente como procedimiento de cribado y aislamiento de anticuerpos a partir de grandes bibliotecas.

**Sumario de la invención**

Dado que se espera que las secuencias de inmunoglobulina codificadas por secuencias de línea germinal canina no sean inmunogénicas en perros, buscamos secuencias de inmunoglobulina de línea germinal que representaran clases de los anticuerpos caninos más abundantes.

Según Bao et al. (Veterinary Immunology and Immunopathology 137 (2010) 64-75) el repertorio génico VH de anticuerpos caninos incluye 80 segmentos VH (de los cuales 41 son funcionales y 39 son pseudogenes), 6 segmentos DH y 3 segmentos JH. El gen VH está formado por la combinación de los diferentes segmentos de los genes V, D y J de dicho repertorio de genes VH y se une mediante la adición o deleción de secuencias codificantes cortas en las uniones VD y VJ para aumentar la diversidad de los anticuerpos. La recombinación VDJ que se produce antes de la entrada en el centro germinal no es completamente aleatoria, pero determinados genes VH se utilizan con más frecuencia que otros.

En caninos se identificó que los segmentos 1-VH62 (Vs624) y 1-VH44 (Vs635) son los segmentos VH más frecuentemente utilizados en células B esplénicas, con una ocurrencia del 27 % para 1-VH62 y 23,4 % para 1-VH44 (Bao et al. 2010). Todas las demás VH se utilizaron con una frecuencia inferior al 11 %. En caninos existen tres familias VH (VH1, VH2 y VH3) de las cuales la mayoría pertenecen a la familia VH1, mientras que 2-VH51, 2-VH64 y 2-VH66 pertenecen a la familia VH2 y 3-VH80 representa el único miembro de la familia VH3.

Las cadenas ligeras de anticuerpos en caninos también se basan en regiones variables codificadas por segmentos de genes V y J y una región constante codificada por genes kappa y lambda. Las secuencias de inmunoglobulina lambda de Canis familiaris pueden agruparse en cuatro familias de cadenas lambda VL [V-I (no. de acceso GenBank XM845300), V-II (no. de acceso GenBank XM543519), V-III (no. de acceso GenBank XM844188) y V-IV (no. de acceso GenBank XM844237)], las secuencias de inmunoglobulina kappa de C. familiaris también se pueden agrupar en cuatro familias de cadenas kappa V-I (no. de acceso Gen Bank XM849621), V-II (no. de acceso Gen Bank XM844874), V-III (no. de acceso GenBank XM849629) y V-IV (no. de acceso GenBank XM849668) secuencias (Braganza et al., Veterinary Immunology and Immunopathology 139 (2011) 27-40). Se observó que los perros expresaban un 90 % de cadenas ligeras lambda y solo un 10 % de cadenas ligeras kappa(Braganza et al., Veterinary Immunology and Immunopathology 139 (2011) 27-40). Sin embargo, la distribución y disposición de las cadenas ligeras específicas de los caninos, así como las combinaciones VH/VL que se dan en los perros, apenas se han caracterizado hasta ahora.

Basándose en la distribución de los genes VH descrita en la bibliografía y en el análisis de similitud de secuencias, se seleccionaron genes VH específicos para la biblioteca sintética de anticuerpos caninos. Para los genes VL se utilizó la información proporcionada en Braganza et al., 2011 y una secuencia consenso basada en las 86 secuencias de la línea germinal de la cadena ligera lambda y las 29 secuencias de la línea germinal de la cadena ligera kappa disponibles en http://vgenerepertoire.org para seleccionar secuencias específicas de la línea germinal de la cadena ligera para la biblioteca sintética de anticuerpos caninos.

Se probaron cinco secuencias representativas de la línea germinal VH canina y seis secuencias representativas de la línea germinal VL canina (4 VL lambda, 2 VL kappa). De las 30 posibles combinaciones VH/VL se identificaron 6 combinaciones que presentaban las siguientes propiedades ventajosas: (i) muestran una alta tasa de visualización en la punta de los fagos filamentosos en formato Fab, (ii) se expresan en forma soluble con un alto contenido monomérico en formato Fab y (iii) se expresan con un alto contenido monomérico en formato IgG.

La selección de los marcos se eligió para optimizar la posibilidad de obtener anticuerpos que posean propiedades biofísicas favorables y que carezcan de las deficiencias de los anticuerpos derivados de bibliotecas sintéticas que no han sido sometidas a maduración in vivo. Tales propiedades biofísicas favorables y deseadas incluyen, por ejemplo, una mayor estabilidad y una baja tendencia a la agregación, como se ejemplifica en la presente memoria.

Para las seis combinaciones VH/VL más favorables, las regiones L-CDR3 y H-CDR3 se sustituyeron por casetes de biblioteca L-CDR3 y H-CDR3 altamente diversificados, respectivamente, consiguiendo así un tamaño global de biblioteca de más de $5\times10^9$ miembros. Se implementaron sitios de restricción respectivos para permitir la inserción de casetes de biblioteca L-CDR3 y H-CDR3.

Además, se eliminaron sitios de modificación postraduccional (PTM) desfavorables de secuencias específicas de la línea germinal para optimizar aún más la expresión y las propiedades biofísicas de los genes VH o VL respectivos y las proteínas correspondientes.

Es importante conocer las modificaciones postraduccionales que se producen en las formulaciones de anticuerpos para aplicaciones terapéuticas. Los PTM no necesariamente tienen lugar en las muestras de anticuerpos producidas para la caracterización inicial in vitro, sin embargo los PTM podrían tener lugar en muestras de anticuerpos de alta concentración y bajo condiciones de almacenamiento prolongado, pero también ocurren in vivo. Así, los PTM pueden interferir con la estabilidad y/o la homogeneidad del anticuerpo y podrían conducir a la pérdida de su funcionalidad. Ejemplos de PTM incluyen pero no se limitan a oxidación (Met, Trp, His), desamidación (Asn, Gln), isomerización (Asp) o glicosilación N-ligada (Asn).

La invención es como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca comprende una o más de las siguientes combinaciones VH/VL: la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No: 13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.: 13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), y la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL VS236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:13), y la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15).

En un aspecto, dichas bibliotecas proporcionadas en la presente memoria comprenden miembros de al menos dos regiones VH1 de línea germinal y al menos dos regiones VL de línea germinal.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que los sitios de modificación postraduccional (PTM) se eliminan de una o más de las regiones VH de la línea germinal o de las regiones VL de la línea germinal.

En un aspecto, dichas combinaciones VH/VL de dicha biblioteca se visualizan en formato Fab, con una tasa de visualización de al menos 0,5 Fab por fago.

En un aspecto, se proporciona en la presente memoria una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan en *E. coli* en formato Fab. En una realización, dichas combinaciones VH/VL expresadas en *E. coli* en formato Fab tienen un contenido monomérico de al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %.

En un aspecto, se proporciona en la presente memoria una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan en un sistema de mamífero en formato IgG. En una realización, dichas combinaciones VH/VL expresadas en un sistema de mamífero en formato IgG tienen un contenido monomérico de al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %.

En un aspecto, se proporciona en la presente memoria una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL son térmicamente estables.

La presente divulgación también proporciona colecciones de moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de dichas bibliotecas sintéticas de anticuerpos caninos.

La presente divulgación también proporciona vectores que codifican dichas moléculas de ácido nucleico.

La presente divulgación también proporciona células hospedadoras recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico o vectores.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para aislar anticuerpos específicos para un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) Poner en contacto las bibliotecas sintéticas de anticuerpos caninos de la presente divulgación con un antígeno;

(b) eliminar los miembros de la biblioteca que no se unen al antígeno (o no son específicos para este); y

(c) recuperar los miembros de la biblioteca unidos al antígeno (o específicos para este).

La presente divulgación también proporciona anticuerpos aislados a partir de las bibliotecas antes mencionadas o del procedimiento antes mencionado.

**Breve descripción de los dibujos**

**Figura 1**

El análisis de la tabla de identidad de 41 genes VH caninos muestra los valores de distancia de todos los pares de secuencias posibles para las secuencias incluidas en el alineamiento. Se indican las puntuaciones de distancia (es decir, 100 menos la puntuación de identidad) entre pares de secuencias. Las puntuaciones de identidad entre pares de secuencias son el porcentaje de residuos idénticos entre todas las posiciones no coincidentes entre los pares.

**Figura 2**

El análisis de la tabla de identidad de 29 genes Vkappa caninos muestra los valores de distancia de todos los pares de secuencias posibles para las secuencias incluidas en el alineamiento. Se indican las puntuaciones de distancia (es decir, 100 menos la puntuación de identidad) entre pares de secuencias. Las puntuaciones de identidad entre pares de secuencias son el porcentaje de residuos idénticos entre todas las posiciones no coincidentes entre los pares.

**Figura 3**

El análisis de la tabla de identidad de 86 genes Vlambda caninos muestra los valores de distancia de todos los pares de secuencias posibles para las secuencias incluidas en el alineamiento. Se indican las puntuaciones de distancia (es decir, 100 menos la puntuación de identidad) entre pares de secuencias. Las puntuaciones de identidad entre pares de secuencias son el porcentaje de residuos idénticos entre todas las posiciones no coincidentes entre los pares.

**Figura 4**

Análisis Western blot de un subconjunto de constructos VH/VL para evaluar las tasas de visualización de Fab.

**Figura 5**

Análisis densiométrico de la mancha mostrada en la figura 4 que indica tasas de visualización adecuadas (por lo general, de 0,5 a 2 Fabs/fagos) para una visualización de fagos eficiente.

**Figura 6**

se analizaron 30 combinaciones VH/VL para determinar la expresión relativa de Fab en lisados de células bacterianas mediante ELISA, donde el nivel de expresión de cada par VH/VL se determinó en relación con la expresión de un control Fab de referencia. Esencialmente, todos los pares Fab VH/VL probados mostraron una expresión relativa de al menos 0,5 de los controles. Los clones Lambda tenían, en promedio, los niveles de expresión Fab relativos más altos. Los números de las muestras se codifican en la tabla 3.

**Figura 7**

Rendimientos de expresión de Fab (indicados como barras; eje izquierdo) y contenidos de monómeros (indicados como puntos; eje derecho) de 30 combinaciones VH/VL. Los números de las muestras se codifican en la tabla 3.

**Figura 8**

Rendimientos de expresión de IgG a escala de investigación (indicados como barras; eje izquierdo) y contenidos de monómeros (indicados como puntos; eje derecho) de 30 combinaciones VH/VL. Los números de las muestras se codifican en la tabla 3.

**Figura 9**

Se muestran las partes esenciales del vector de visualización de fagos pCaDis, incluidos los sitios de restricción únicos relevantes.

**Figura 10**

Se muestran las partes esenciales del vector de expresión Fab bacteriano pCaBx, incluidos los sitios de restricción únicos relevantes.

**Figura 11**

Alta calidad y corrección de la biblioteca de anticuerpos caninos como muestra la distribución de genes maestros VH según lo esperado por la composición de la biblioteca.

**Figura 12**

La distribución de aminoácidos diseñada (barra izquierda) en comparación con los aminoácidos obtenidos en las posiciones correspondientes (barra derecha) en la biblioteca para una CDR de cadena ligera ejemplar confirma una composición precisa y correcta de la biblioteca sintética.

**Figura 13**

El diseño de la distribución de longitudes CDR-H3 (barras blancas) en comparación con la distribución de longitudes CDR-H3 obtenida (barras oscuras) tras el control de calidad MiSeq NGS de ~ 7,9 millones de secuencias.

**Figura 14**

Visualización mediante Dot Blot del resultado del cribado Fab. La señal sobre los valores de fondo de la unión específica a la eGFP se representa en el eje x (ELISA directo), los resultados de la expresión del Fab se muestran en el eje y (señal sobre el fondo en un ELISA de captura del Fab). La forma de los puntos indica el subcódigo de paneo correspondiente.

**Descripción detallada de la invención**

A menos que se defina lo contrario todos los términos científicos y tecnológicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado tal como lo entienden comúnmente los expertos en la técnica.

Los términos **"aproximadamente"** o **"alrededor de"** en el contexto de valores numéricos e intervalos se refieren a valores o intervalos que se aproximan o están cerca de los valores o intervalos recitados de tal manera que la invención puede funcionar como se pretende, como tener un número o porcentaje deseado de homología de secuencia, como es evidente para el experto a partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria. Esto se debe, al menos en parte, a las distintas condiciones de cultivo y a la variabilidad de los sistemas biológicos. De este modo, estos términos abarcan valores que van más allá de los resultantes del error sistemático. Estos términos hacen explícito lo que está implícito.

Todos los intervalos expuestos en la presente memoria en el sumario y descripción de la invención incluyen todos los números o valores alrededor o entre los números del intervalo. Los intervalos de la invención denominan y establecen expresamente todos los valores enteros, decimales y fraccionarios del intervalo. El término "aproximadamente" puede utilizarse para describir un intervalo.

El término **"anticuerpo"** , como se utiliza en la presente memoria, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, **"porción de unión a antígeno")** o cadenas simples de los mismos. Un "anticuerpo" natural es una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada de un anticuerpo IgG, IgA o IgD consta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3, mientras que la cadena pesada de un anticuerpo IgM e IgE consta de cuatro dominios CH1, CH2, CH3, CH4. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera consta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. La extensión de la región marco y de las CDR 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). Las regiones marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirven para posicionar y alinear las CDR, que son las principales responsables de la unión a un antígeno.

Los términos **"porción de unión a antígeno"** o **"fragmento"** de un anticuerpo se utilizan de forma equivalente en la presente solicitud. Estos términos se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno determinado. Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo pueden ser realizadas por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y una región aislada determinante de la complementariedad (CDR). Las porciones o fragmentos de unión a antígeno preferidos de los anticuerpos son los fragmentos Fab.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando procedimientos recombinantes, mediante un enlazante peptídico artificial que permite fabricarlos como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; y Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci., 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena simple incluyen una o más "porciones de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno también pueden incorporarse a anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136). Las porciones de unión a antígeno de los anticuerpos pueden injertarse en andamiajes basados en polipéptidos como la Fibronectina tipo III (Fn3) (véase U.S. Pat. No. 6,703,199, que describe los monocuerpos polipeptídicos de fibronectina). Las porciones de unión a antígeno pueden incorporarse a moléculas de cadena simple que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno(Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8(10):1057-1062; y U.S. Pat. No. 5,641,870).

El término **"anticuerpo canino",** como se utiliza en la presente memoria, se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto la estructura como las regiones CDR se derivan de secuencias de origen canino. Por ejemplo, tanto las regiones marco como las CDR pueden derivarse de secuencias de origen canino. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de tales secuencias caninas, por ejemplo, secuencias de línea germinal canina, o versiones mutadas de secuencias de línea germinal canina. Los anticuerpos caninos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias caninas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo).

El término **"repertorio inmunitario canino virgen"** se refiere a un repertorio de ácidos nucleicos aislados de células B inexpertas en antígenos del sistema inmunitario de un perro, en el que los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos no han sufrido hipermutación somática, por lo tanto se considera que comprenden los ácidos nucleicos de los genes de la línea germinal, con la aparición de reordenamiento del segmento génico V(D)J. Un repertorio puede ser el de un individuo o el de una población. Preferentemente, el repertorio inmunitario se obtiene de múltiples individuos para evitar sesgos en la muestra.

Por **"repertorio inmunitario canino"** se entiende un repertorio de ácidos nucleicos aislados de células B del sistema inmunitario de un perro. Un repertorio puede ser el de un individuo o el de una población, y puede proceder de células B ingenuos y/o de células B experimentadas con antígenos. Preferentemente, el repertorio inmunitario se obtiene de múltiples individuos para evitar sesgos en la muestra.

El término **"anticuerpo aislado"** se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades de unión antigénica. Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un antígeno puede tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

El término **"isotipo"** se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgA, IgG tal como IgG1 o IgG4) que proporcionan los genes de la región constante de la cadena pesada. En los caninos existen cuatro subclases de IgG: IgG-A, IgG-B, IgG-C e IgG-D(L.M. Bergeron et al. Veterinary Immunology and Immunopathology 157 (2014) 31-41). El isotipo también incluye versiones modificadas de una de estas clases, en las que se han realizado modificaciones para alterar la función Fc, por ejemplo, para potenciar o reducir las funciones efectoras o la unión a receptores Fc.

Los términos **"anticuerpo monoclonal"** o "composición de anticuerpo monoclonal" utilizados en la presente memoria se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpos monoclonales muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítopo concreto.

El término **"biblioteca"** se refiere a una colección de moléculas distintas que comprende por lo general más de $10^3$, más de $10^4$, más de $10^5$, más de $10^6$, más de $10^7$, más de $10^8$, más de $10^9$ o incluso más de $10^{10}$ miembros. En el contexto de la presente invención, una biblioteca es una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La

biblioteca se compone de miembros, cada uno de los cuales tiene una única secuencia polipeptídica o de ácido nucleico. Las diferencias de secuencia entre los miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede adoptar la forma de una simple mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede presentarse en forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, fagos, células animales o vegetales, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferentemente, cada organismo o célula individual contiene sólo uno o un número limitado de miembros de la biblioteca. Ventajosamente, los ácidos nucleicos se incorporan a vectores de expresión, para permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En determinado aspecto, una biblioteca puede adoptar la forma de una población de organismos hospedadores, cada organismo conteniendo una o más copias de un vector de expresión que contiene un único miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que puede expresarse para producir su correspondiente miembro polipeptídico. De este modo, la población de organismos hospedadores tiene el potencial de codificar un gran repertorio de variantes polipeptídicas genéticamente diversas. El término **"colección"** se utiliza indistintamente con el término **"biblioteca".**

Las bibliotecas de anticuerpos pueden derivarse de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, que estén sesgadas hacia determinadas especificidades presentes en animales inmunizados o humanos naturalmente inmunizados o infectados. Alternativamente, las bibliotecas de anticuerpos pueden derivarse de inmunoglobulinas vírgenes, o fragmentos de las mismas, es decir, inmunoglobulinas que no están sesgadas hacia especificidades que se encuentran en el sistema inmunitario. Tales bibliotecas se denominan "no sesgadas". En realizaciones preferidas, la presente divulgación proporciona bibliotecas de anticuerpos no sesgadas, es decir, las bibliotecas no están preexpuestas al antígeno de interés. Debido a la ausencia de sesgos, tales bibliotecas comprenden anticuerpos que se unen a cualquier antígeno diana potencial de interés.

Por lo general, las bibliotecas de anticuerpos inmunes se construyen con grupos de genes VH y VL que se clonan a partir de células B fuente mediante técnicas de clonación basadas en PCR (o relacionadas). Del mismo modo, también es posible generar bibliotecas de anticuerpos no sesgados y vírgenes. Sin embargo, las bibliotecas de anticuerpos vírgenes, no sesgados también pueden generarse de forma sintética, en la que toda la biblioteca se construye completamente in vitro. Se emplea la tecnología del ADN recombinante, que puede utilizarse para imitar los sesgos y redundancias naturales del repertorio natural de anticuerpos. Tales bibliotecas de anticuerpos se denominan bibliotecas de anticuerpos **"sintéticas"** . El término biblioteca **"totalmente sintética"** se refiere a las bibliotecas de anticuerpos que están completamente, es decir, totalmente, construidas de novo por síntesis de ADN, por ejemplo, por síntesis génica total, procedimientos basados en PCR o tecnologías de ADN relacionadas. En tales bibliotecas, todo el ADN se construye de novo, es decir, la parte que codifica las CDR, así como las partes (por ejemplo, las regiones marco) que codifican las partes que rodean las CDR de los anticuerpos de la biblioteca. Los términos "sintética" y "totalmente sintética" se refieren, por lo tanto, al origen de novo del ADN. Por el contrario, en una biblioteca de anticuerpos "semisintética" sólo partes de los anticuerpos de la biblioteca se construyen de novo, mientras que otras partes, por ejemplo determinadas regiones CDR, se derivan de fuentes naturales (existen numerosas revisiones sobre este asunto, véase por ejemplo Sidhu et al.; Nat Chem Biol (2006), 2, 682-8). La presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos. En un aspecto preferido, la presente divulgación proporciona una biblioteca de anticuerpos caninos totalmente sintética.

El término **"línea germinal completa"** se refiere a las secuencias de nucleótidos de los genes y segmentos de genes de anticuerpos tal y como se transmiten de padres a hijos a través de las células germinales. La secuencia de la línea germinal se distingue de las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos en las células B maduras, que han sido alteradas por eventos de recombinación e hipermutación durante el curso de la maduración de las células B. El término **"línea germinal"** se refiere a secuencias totalmente de línea germinal y, además, a secuencias de línea germinal que han sido modificadas o diseñadas con mutaciones menores en la secuencia de aminoácidos, como, por ejemplo, con el fin de eliminar sitios de modificación postraduccional (PTM) no deseados, eliminar cisteína no deseada, optimizar el anticuerpo (por ejemplo, afinidad, semivida) o introducir el sitio de restricción deseado, o modificaciones resultantes de errores de síntesis, amplificación o clonación.

El término **"modificación postraduccional"** o **"PTM"** se refiere a una modificación generalmente enzimática de las proteínas durante o después de la biosíntesis proteica. Las modificaciones postraduccionales pueden producirse en las cadenas laterales de aminoácidos o en los extremos C o N de la proteína. Pueden ampliar el repertorio químico de los 20 aminoácidos estándar introduciendo nuevos grupos funcionales tales como fosfato, acetato, grupos amida o grupos metilo. Muchas proteínas eucariotas también tienen moléculas de hidratos de carbono unidas a ellas en un procedimiento denominado glucosilación, que puede favorecer el plegamiento de las proteínas y mejorar su estabilidad, además de cumplir funciones reguladoras. Las modificaciones se producen en los denominados sitios de modificación postraduccional (es decir, motivos de aminoácidos definidos) que incluyen específicamente, sitios de glucosilación ligados a N (NxS o NxT) o modificaciones químicas tales como la escisión de Asp (a menudo en un DP), la isomerización de Asp (DS, DG), la desamidación (NS, NG). Las metioninas pueden oxidarse cuando se exponen al disolvente. Las modificaciones pueden producirse in vivo (en el suero) o durante el almacenamiento en el tampón de formulación y provocar la pérdida de la unión del anticuerpo).

El término **"región variable de la línea germinal"** significa:

a) una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos de una región variable de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo codificado por un gen de la línea germinal;

b) una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos de una región variable de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo codificado por un gen de la línea germinal, en la que la secuencia de ácido nucleico se modifica, por ejemplo, mediante la optimización de codones, la adición de sitios de restricción deseados, la optimización del contenido de GC, la eliminación de sitios de modificación postraduccional (PTM) no deseados, la eliminación de sitios de empalme de ARNm no deseados o la eliminación de motivos de inestabilidad de ARNm, o

c) una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos de una región variable de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo codificado por un gen de la línea germinal, pero con pequeñas mutaciones en la secuencia de aminoácidos, tal como, para eliminar sitios de modificación postraduccional (PTM) no deseados, eliminar cisteína no deseada o introducir un sitio de restricción deseado, o modificaciones resultantes de errores de síntesis, amplificación o clonación.

En el sentido de la presente divulgación, una **"región variable de la línea germinal "** es una **"región VH de línea germinal"** o una **"región VL de línea germinal".** En la tabla 1 se muestran ejemplos de "regiones variables de línea germinal" caninas.

El término **"combinación de cadena pesada variable y cadena ligera variable"** o "**combinación** VH/VL**"** significa la combinación (emparejamiento) de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable. Un anticuerpo y un fragmento funcional, por ejemplo un Fab, comprenden al menos una cadena pesada variable unida a una cadena ligera variable, que forman la región de unión al antígeno.

El término **"ácido nucleico"** se utiliza en la presente memoria indistintamente con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces del esqueleto modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de forma similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes conservadoramente modificadas de la misma (por ejemplo, sustituciones degeneradas de codones) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. En concreto, como se detalla más adelante, las sustituciones degeneradas de codones pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina (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).

Como se utiliza en la presente memoria, el término **"optimizado"** significa que una secuencia de nucleótidos ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos usando codones que son preferidos en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de Pichia, una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se diseña para conservar completamente o en la mayor medida posible la secuencia de aminoácidos codificada originalmente por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como secuencia **"parental"** . Las secuencias en la presente memoria optimizadas han sido diseñadas para tener codones preferidos en células de mamíferos. Sin embargo, también se contempla la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas o procariotas. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de nucleótidos optimizadas también se denominan optimizadas.

El término **"aminoácido"** se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos modificados posteriormente, por ejemplo, la hidroxiprolina, el γ-carboxiglutamato y la O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Por miméticos de aminoácidos se refiere a los compuestos químicos que tienen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de forma similar a un aminoácido natural.

Los términos **"polipéptido"** y **"proteína"** se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales y a los polímeros de aminoácidos no naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también abarca implícitamente variantes conservadoramente modificadas de la misma.

Los términos **"idéntico"** o porcentaje de **"identidad",** en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, 60 % de identidad, opcionalmente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % de identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada como medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferentemente sobre una región que tiene de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, por lo general una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar los parámetros por defecto del programa o designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia de las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

El término **"anticuerpo recombinante",** como se utiliza en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo, anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar un anticuerpo de roedor, humano o canino, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante y combinatoria de anticuerpos caninos, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de todo o parte de un gen de inmunoglobulina canina, secuencias con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos caninos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal canina. En determinadas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos caninos recombinantes pueden someterse a mutagénesis in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias Ig caninas, a mutagénesis somática in vivo) y, de este modo, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de secuencias VH y VL de la línea germinal canina y relacionadas con ellas, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de anticuerpos caninos de la línea germinal in vivo.

El término **"célula hospedadora recombinante"** (o simplemente "célula hospedadora") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos se refieren no sólo a la célula en cuestión, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias medioambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula progenitora, pero aun así se incluye en el ámbito del término "célula hospedadora" como se utiliza en la presente memoria.

El término **"vector"** se refiere a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN.

Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, los vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y así se replican junto con el genoma hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están vinculados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante suelen adoptar la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como los vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

Un **"vector de visualización"** 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 ella. Tales secuencias de ADN son bien conocidas en la técnica. Los vectores de visualización pueden ser, por ejemplo, vectores fago o vectores fagémidos procedentes de la clase de los bacteriófagos filamentosos fd, M13 o fl. Tales vectores son capaces de facilitar la visualización de una proteína que incluya, por ejemplo, una proteína de unión o un fragmento de la misma, en la superficie de un bacteriófago filamentoso. Los vectores de visualización adecuados para su visualización en fagos, ribosomas, ADN, células bacterianas o células eucariotas, por ejemplo, levaduras o células de mamífero, también son conocidos en la técnica, por ejemplo, al igual que los vectores virales o los vectores que codifican proteínas quiméricas.

Los sitios de restricción que son **"únicos"** son sitios de restricción que existen o aparecen sólo una vez en una molécula de ácido nucleico dada. Por lo general, dicha molécula de ácido nucleico es un vector que codifica los miembros de la biblioteca de la presente invención.

El término **"uso de aminoácidos dependiente de la posición"** se refiere a la probabilidad de aparición de una secuencia particular de aminoácidos en una posición determinada en un polipéptido. En la presente invención, el uso de aminoácidos dependiente de la posición se determinó para las secuencias de aminoácidos reordenadas clasificadas por el gen de la línea germinal individual. Esto permite el diseño individual y preciso de las CDR dentro de su contexto natural de línea germinal.

Como se utiliza en la presente memoria, el término **"esencialmente todo"** significa que el componente al que se refiere es más o menos puro. Sólo existen pequeñas cantidades u otros componentes diferentes que no limitan ni afectan a la propiedad ventajosa del componente. Dependiendo de la naturaleza del componente, esencialmente todos pueden referirse al menos al 60 %, al menos al 65 %, al menos al 70 %, al menos al 75 %, al menos al 80 %, al menos al 85 %, al menos al 90 %, al menos al 95 % o al menos al 99 % de dicho componente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término **"PTM-bajo"** se refiere a una secuencia de aminoácidos VH y/o VL de la línea germinal del anticuerpo que se ha modificado dentro de Kabat H-CDR1 y/o H-CDR2 para eliminar posibles sitios de modificación postraduccional (PTM). Preferentemente, los motivos PTM potenciales en las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 no se modifican.

Las **secuencias de aminoácidos de la región** J para FR4 de la cadena pesada, de la cadena ligera kappa y de la cadena ligera lambda son WGQGTLVTVSS (SEQ ID No.: 37), FGAGTKVELK (SEQ ID No.: 38 y FGGGTQLTVL (SEQ ID No: 39), respectivamente, como se muestra en la tabla 2.

**Realizaciones de la invención**

La presente invención proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca comprende una o más de las siguientes combinaciones VH/VL: la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.: 13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.: 13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), y la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL VS236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:13), y la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15).

En otros aspectos, dicha biblioteca comprende miembros de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro regiones VH1 de la línea germinal.

En determinados aspectos, dichas regiones VH1 de línea germinal se seleccionan entre Vs618 (SEQ ID No.:4), Vs624 (SEQ ID No.:1), Vs628 (SEQ ID No.:5) y Vs635 (SEQ ID No.:2).

En determinados aspectos, las bibliotecas sintéticas de anticuerpos caninos divulgadas en la presente memoria no son sesgadas. En determinados aspectos, las bibliotecas sintéticas de anticuerpos caninos divulgadas en la presente memoria son bibliotecas de anticuerpos caninos totalmente sintéticas.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende más del 50 % del repertorio VH canino natural. En otros aspectos, dicha biblioteca comprende más del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 % o más del 95 % del repertorio natural canino de VH.

En otros aspectos, dicha biblioteca comprende miembros de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro o al menos cinco regiones VL de la línea germinal.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende miembros de al menos una región VH1 de línea germinal y de al menos una región VL de línea germinal.

En otros aspectos, dicha biblioteca comprende miembros de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro regiones VH1 de línea germinal y de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro o al menos cinco regiones VL de línea germinal.

En determinados aspectos, una o más de dichas regiones VH1 de línea germinal y regiones VL de línea germinal son variantes optimizadas de regiones VH1 de línea germinal o regiones VL de línea germinal.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende combinaciones VH/VL de al menos una región VH1 de línea germinal y de al menos una región VL de línea germinal.

En otros aspectos, dicha biblioteca comprende combinaciones VH/VL de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro regiones VH1 de línea germinal y de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro o al menos cinco regiones VL de línea germinal.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende H-CDR3 que cubren más del 50 % de las longitudes H-CDR3 naturales del repertorio H-CDR3 canino. En otros aspectos, dicha biblioteca comprende más del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 % o más del 95 % de las longitudes H-CDR3 naturales del repertorio H-CDR3 canino.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que las regiones H-CDR3 de esencialmente todos los miembros de la biblioteca están flanqueadas por sitios de restricción únicos.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende H-CDR3s de la longitud Kabat de 5-16 aminoácidos. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende H-CDR3 de la longitud Kabat de 5 aminoácidos y/o 6 aminoácidos y/o 7 aminoácidos y/o 8 aminoácidos y/o 9 aminoácidos y/o 10 aminoácidos y/o 11 aminoácidos y/o 12 aminoácidos y/o 13 aminoácidos y/o 14 aminoácidos y/o 15 aminoácidos y/o 16 aminoácidos.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende un diseño H-CDR3 como se muestra en las tablas 4-15.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que la región H-CDR3 tiene una diversidad de al menos $1,0*10^9$. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos cuya región H-CDR3 tiene una diversidad de al menos $1,0*10^{10}$, de al menos $1,0*10^{11}$, de al menos $1,0*10^{12}$ o de al menos $1,0*10^{13}$.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que las regiones L-CDR3 de esencialmente todos los miembros de la biblioteca están flanqueadas por sitios de restricción únicos.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende L-CDR3 que cubren más del 80 % de las longitudes L-CDR3 que ocurren naturalmente del repertorio L-CDR3 canino. En otros aspectos, dicha biblioteca comprende más del 85 %, más del 90 % o más del 95 % de las longitudes L-CDR3 naturales del repertorio L-CDR3 canino.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende un Kabat L-CDR3 para Vkappa de la longitud de 9 aminoácidos. En determinados aspectos, la presente invención proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que el L-CDR3 de esencialmente todos los miembros Vkappa de la biblioteca es de la longitud Kabat de 9 aminoácidos.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende una L-CDR3 para Vlambda de la longitud Kabat de 10 y/u 11 aminoácidos. En determinados aspectos, la presente invención proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que la L-CDR3 de esencialmente todos los miembros Vlambda de la biblioteca tiene una longitud de 10 y/u 11 aminoácidos.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende un diseño Vkappa L-CDR3 como se muestra en la tabla 16.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende un diseño Vlambda L-CDR3 como se muestra en las tablas 17-18.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que la región L-CDR3 tiene una diversidad de al menos $1,0*10^4$. En otros aspectos, la presente invención proporciona

una biblioteca sintética de anticuerpos caninos cuya región L-CDR3 tiene una diversidad de al menos $1,0*10^5$, de al menos $1,0*10^6$, de al menos $1,0*10^7$ o de al menos $1,0*10^8$

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende un diseño H-CDR3 como se muestra en las tablas 4-15 y un diseño L-CDR3 como se muestra en la tabla 16 y en las tablas 17-18.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se visualizan eficientemente en una partícula de fago.

En otros aspectos más, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende al menos dos o al menos tres regiones VH de línea germinal y al menos dos o al menos tres regiones VL de línea germinal, en la que cada una de las combinaciones VH/VL comprendidas en dicha biblioteca se visualiza eficientemente. La eficacia de la visualización puede medirse mediante ELISA de fagos en sándwich como se describe en el ejemplo 2.6. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende al menos dos o al menos tres regiones VH de la línea germinal y al menos dos o al menos tres regiones VL de la línea germinal, en la que cada una de las combinaciones VH/VL comprendidas en dicha biblioteca se visualiza eficientemente, teniendo una tasa de visualización de al menos 0,5 Fab por fago. En otras realizaciones, la tasa de visualización es de al menos 0,6, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, al menos 2,1, al menos 2,2, al menos 2,3, al menos 2,4 al menos 2,5, al menos 2,6, al menos 2,7, al menos 2,8, al menos 2,9, al menos 3,0, al menos 3,1, al menos 3,2, al menos 3,3, al menos 3,4, al menos 3,5, al menos 3,6, al menos 3,7, al menos 3,8, al menos 3,9 o al menos 4 Fab por fago.

En otros aspectos más, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende al menos dos o al menos tres regiones VH de línea germinal y al menos dos o al menos tres regiones VL de línea germinal, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL expresadas en E. coli en formato Fab tienen un contenido monomérico de al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %. En otros aspectos más, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende al menos dos o al menos tres regiones VH de línea germinal y al menos dos o al menos tres regiones VL de línea germinal, en la que cada una de las combinaciones VH/VL comprendidas en dicha biblioteca se expresa en E. coli en formato Fab tiene un contenido monomérico de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan en E. coli en formato Fab. En otros aspectos más, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende al menos dos o al menos tres regiones VH de línea germinal y al menos dos o al menos tres regiones VL de línea germinal, en la que cada una de las combinaciones VH/VL comprendidas en dicha biblioteca está bien expresada en E. coli en formato Fab. La expresión en formato Fab en E. coli puede cuantificarse.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan a niveles de más de 1 mg/l en un cultivo bacteriano.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan a niveles de más de 5 mg/l en un cultivo bacteriano.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que la mayoría de las combinaciones VH/VL se expresan a niveles de más de 10 mg/l en un cultivo bacteriano.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco combinaciones VH/VL se expresan a niveles de más de 1 mg/l en un cultivo bacteriano.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL están bien expresadas en un sistema de mamífero en formato IgG. En otros aspectos más, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende al menos dos o al menos tres regiones VH de línea germinal y al menos dos o al menos tres regiones VL de línea germinal, en la que cada una de las combinaciones VH/VL comprendidas en dicha biblioteca se expresa bien en un sistema de mamífero en formato IgG. Se puede cuantificar la expresión en un sistema de mamíferos en formato IgG. En determinados aspectos, dicho sistema de mamíferos es un cultivo en suspensión de mamíferos. En otros aspectos, dicho sistema mamífero es un cultivo de células adherentes de mamífero. En determinados aspectos, dicho formato IgG es un formato IgG-B canino. En otros aspectos, dicho formato IgG es un formato canino IgG-A, IgG-C o IgG-D. En determinados aspectos, dicho sistema mamífero comprende células HKB11. En otros aspectos, dicho sistema mamífero comprende células PERC.6. En otros aspectos, dicho sistema mamífero comprende células CHO. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan a niveles de más de 5 mg/l en un sistema de mamífero en formato IgG. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos

caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan a niveles de más de 10 mg/l en un sistema de mamífero en formato IgG. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que la mayoría de las combinaciones VH/VL se expresan a niveles de más de 15 mg/l en un sistema de mamífero en formato IgG. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis combinaciones VH/VL se expresan a niveles de más de 20 mg/l en un sistema de mamífero en formato IgG.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que todos o sustancialmente todos los miembros de dicha biblioteca son estables en isopropanol a una concentración del 30 % (v/v). Se supone que todos los derivados CDR de un marco estable se comportarán como los pares VH/VL probados.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que todas o sustancialmente todas las combinaciones VH/VL son térmicamente estables. La estabilidad térmica puede medirse como se describe en la presente solicitud. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL tienen una $T_m$ de más de 62 °C. En otros aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL tienen una $T_m$ de más de 64 °C. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL tienen una $T_m$ de más de 66 °C. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que la mayoría de las combinaciones VH/VL tienen una $T_m$ de más de 68 °C. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que muchas combinaciones VH/VL tienen una $T_m$ de más de 70 °C. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que todas o sustancialmente todas las combinaciones VH1 tienen una $T_m$ de más de 70 °C.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican la biblioteca como se divulga en la presente memoria.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende miembros de al menos una región VH1 de línea germinal y de al menos una región VL de línea germinal. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que dicha biblioteca comprende miembros de al menos dos o al menos tres regiones VH1 de línea germinal y de al menos dos o al menos tres regiones VL de línea germinal. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos en la que dicha biblioteca comprende miembros de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro regiones VH1 de línea germinal y de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro regiones VL de línea germinal y en la que dichas moléculas de ácido nucleico que codifican dichas regiones VH1 de línea germinal se seleccionan de Vs618 (SEQ ID No.:22), Vs624 (SEQ ID No.:19), Vs628 (SEQ ID No.:23) y Vs635 (SEQ ID No.:20) y en las que dichas moléculas de ácido nucleico que codifican dichas regiones VL de línea germinal se seleccionan entre Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34), Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31) y Vs834 (lambda) (SEQ ID No.:33). En determinados aspectos, dichas moléculas de ácido nucleico que codifican dichas regiones VH1 de la línea germinal se seleccionan entre Vs618 (SEQ ID No.:22), Vs624 (SEQ ID No.:19), Vs628 (SEQ ID No.:23) y Vs635 (SEQ ID No.:20), y dichas moléculas de ácido nucleico que codifican dichas regiones VL de la línea germinal se seleccionan entre Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34), Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31), y Vs834 (lambda) (SEQ ID No.:33), en las que se eliminan los sitios de modificación postraduccional (PTM). En determinados aspectos, dichas moléculas de ácido nucleico se seleccionan entre Vs618-PTM-bajo (SEQ ID No.:22), Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:24), Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:28) y Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:25) y de Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:36), VS843 (lambda) (SEQ ID No.:33) y Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31).

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende combinaciones VH/VL de al menos una región VH1 de línea germinal y de al menos una región VL de línea germinal. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende combinaciones VH/VL de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro regiones VH1 de línea germinal y de al menos dos o al menos tres o al menos cuatro o al menos cinco regiones VL de línea germinal. En determinados aspectos, dichas moléculas de ácido nucleico que codifican dichas regiones VH1 de la línea germinal se seleccionan entre Vs618 (SEQ ID No.:22), Vs624 (SEQ ID No.:19) y Vs635 (SEQ ID No..20) y dichas moléculas de ácido nucleico que codifican dichas regiones VL de la línea germinal se seleccionan entre Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34) y Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31). En determinados aspectos, dichas moléculas de ácido nucleico que codifican dichas regiones VH1 de la línea germinal se seleccionan entre Vs618 (SEQ ID No.:22), Vs624 (SEQ ID No.:19), Vs628 (SEQ ID No.:23) y Vs635 (SEQ ID No.:20), y dichas moléculas de ácido nucleico que codifican dichas regiones VL de la línea germinal se seleccionan entre Vs236 (kappa) (SEQ ID No..:30), Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34), Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31) y Vs843 (lambda)

(SEQ ID No.:33), en las que se eliminan los sitios de modificación postraduccional (PTM). En determinados aspectos, dichas moléculas de ácido nucleico se seleccionan entre Vs618-PTM-bajo (SEQ ID No.:22), Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:24) y Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:25) y de Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:36), Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31) y Vs843 (lambda) (SEQ ID No: 33).

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende combinaciones VH/VL seleccionadas de las combinaciones VH/VL codificadas por las moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones VH1 de línea germinal seleccionadas de Vs618 (SEQ ID No.:22), Vs624 (SEQ ID No.:19), Vs628 (SEQ ID No.:23 y Vs635 (SEQ ID No.:20) y moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones VL de la línea germinal seleccionadas entre Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34), Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31) y Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:33). En determinados aspectos de la presente divulgación, dichas moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos son idénticas con una identidad de al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % a las moléculas de ácido nucleico seleccionadas de Vs618 (SEQ ID No.:22), Vs624 (SEQ ID No.:19), Vs628 (SEQ ID No.:23 o Vs635 (SEQ ID No.:20), Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34), Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31) y/o Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:33).

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho o al menos nueve combinaciones VH/VL codificadas por las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22) y la región VL de la línea germinal Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs624 (SEQ ID No.:19) y la región VL de la línea germinal Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs635 (SEQ ID No.:20) y la región VL de la línea germinal Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22) y la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs624 (SEQ ID No.:19) y la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31) y las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs635 (SEQ ID No.:20) y la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31). En determinados aspectos, los ácidos nucleicos son variantes optimizadas de uno o más de los ácidos nucleicos que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22), la región VL de la línea germinal Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), la región VH1 de la línea germinal Vs624 (SEQ ID No.:19), la región VL de la línea germinal Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), la región VH1 de la línea germinal Vs635 (SEQ ID No.:20), la región VL de la línea germinal Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34), la región VH1 de la línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22), la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31), la región VH1 de la línea germinal Vs624 (SEQ ID No.:19), la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31), la región VH1 de la línea germinal Vs635 (SEQ ID No.:20) y/o la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31). En determinados aspectos, los ácidos nucleicos son variantes con PTM-bajo de uno o más de los ácidos nucleicos que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22), la región VL de la línea germinal Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), la región VH1 de la línea germinal Vs624 (SEQ ID No.:19), la región VL de la línea germinal Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), la región VH1 de la línea germinal Vs635 (SEQ IDNo.:20), la región VL de la línea germinal Vs323 (lambda) (SEQ ID No.:34), la región VH1 de la línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22), la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31), la región VH1 de la línea germinal Vs624 (SEQ ID No.19), la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31), la región VH1 de la línea germinal Vs635 (SEQ ID No.:20) y/o la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31).

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican una biblioteca sintética de anticuerpos caninos que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho o al menos nueve combinaciones VH/VL codificadas por las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de línea germinal Vs618-PTM-bajo (SEQ ID No.:27) y la región VL de la línea germinal Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:24) y la región VL de la línea germinal Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:30), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:25) y la región VL de la línea germinal Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:36), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs618-PTM-bajo (SEQ ID No.:27) y la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:24) y la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31) y las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:25) y la región VL de la línea germinal Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:31), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22) y la región VL de la línea germinal Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:33), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:24) y la región VL de la línea germinal Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:33), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:25) y la región VL de la línea germinal Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:33), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22) y la región VL de la línea germinal Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:36), las

moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:24) y la región VL de la línea germinal Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:36), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs618 (SEQ ID No.:22) y la región VL de la línea germinal Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:24) y la región VL de la línea germinal Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32), las moléculas de ácido nucleico que codifican la región VH1 de la línea germinal Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:25) y la región VL de la línea germinal Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:32).

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un vector que codifica las moléculas de ácido nucleico según se divulga en las realizaciones de la presente divulgación.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende las moléculas de ácido nucleico divulgadas en las realizaciones de la presente divulgación.

En un aspecto la presente divulgación proporciona un procedimiento para aislar un anticuerpo específico para un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) Poner en contacto la biblioteca según una cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria con un antígeno;

(b) eliminar los miembros de la biblioteca que no se unen al antígeno; y

(c) recuperar los miembros de la biblioteca unidos al antígeno.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos caninos que poseen propiedades biofísicas favorables. Tales anticuerpos carecen de los defectos de los anticuerpos derivados de bibliotecas sintéticas que no han sido sometidos a maduración in vivo. Tales propiedades biofísicas favorables y deseadas incluyen una mayor estabilidad, mayores niveles de expresión y una baja tendencia a la agregación.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado de una biblioteca canina contemplada por la presente divulgación. En determinados aspectos dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado o una variante de un anticuerpo aislado de una biblioteca canina contemplada por la presente divulgación.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que los sitios de modificación postraduccional (PTM) se eliminan de una o más de las regiones VH de línea germinal o de las regiones VL de línea germinal.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL de dicha biblioteca se visualizan eficientemente a una tasa de visualización de al menos 0,5 Fab por fago.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL tienen un contenido monomérico de al menos el 85 % cuando se expresan en E. coli en formato Fab.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL tienen un contenido monomérico de al menos 90 % cuando se expresan en un sistema de mamífero en formato IgG.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que todas las combinaciones VH/VL son térmicamente estables. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican los miembros de la biblioteca antes mencionada

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un vector que codifica las moléculas de ácido nucleico antes mencionadas.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende las moléculas de ácido nucleico antes mencionadas o el vector antes mencionado.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona un procedimiento para aislar un anticuerpo específico para un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) poner en contacto la biblioteca antes mencionada con un antígeno;

(b) eliminar los miembros de la biblioteca que no se unen al antígeno; y

(c) recuperar los miembros de la biblioteca unidos al antígeno.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado a partir de la biblioteca antes mencionada o aislado mediante el procedimiento antes mencionado.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca comprende H-CDR3 que cubren más del 50 % de las longitudes H-CDR3 naturales del repertorio H-CDR3 canino.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca comprende H-CDR3 de la longitud Kabat de 5-16 aminoácidos.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca tiene un diseño H-CDR3 como se muestra en la tabla 4- tabla 15.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca tiene una diversidad de al menos 5E+09 en la región H-CDR3.

En determinados aspectos la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, donde la L-CDR3 de la biblioteca es de la longitud Kabat de 8 aminoácidos (kappa) y de la longitud Kabat de 10 y 11 aminoácidos (lambda).

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca tiene un diseño L-CDR3 como se muestra en la tabla 16 y las tablas 17-18.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca tiene una diversidad de al menos 1E+04 en la región L-CDR3.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL de dicha biblioteca se visualizan eficientemente.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL de dicha biblioteca se visualizan eficientemente, teniendo una tasa de visualización de al menos 0,5 Fab por fago.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan en E. coli en formato Fab.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL expresadas en E. coli en formato Fab tienen un contenido monomérico de al menos 85 %.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL se expresan en un sistema de mamífero en formato IgG.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL expresadas en un sistema de mamífero en formato IgG tienen un contenido monomérico de al menos 90 %.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que todas las combinaciones VH/VL son térmicamente estables.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que las regiones H-CDR3 de esencialmente todos los miembros de la biblioteca están flanqueadas por sitios de restricción únicos.

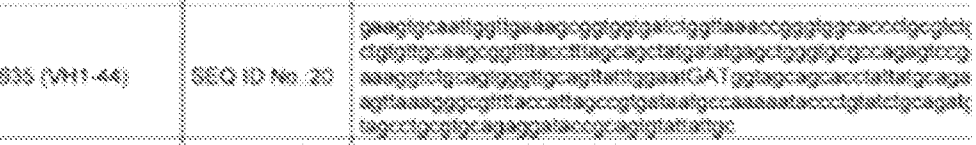
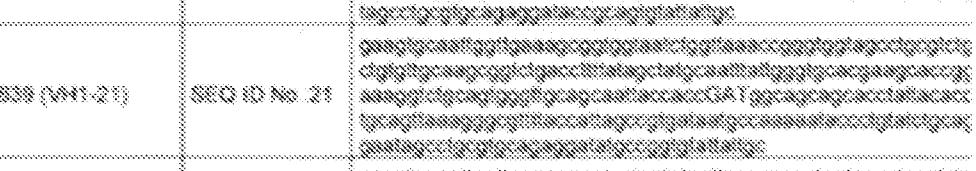
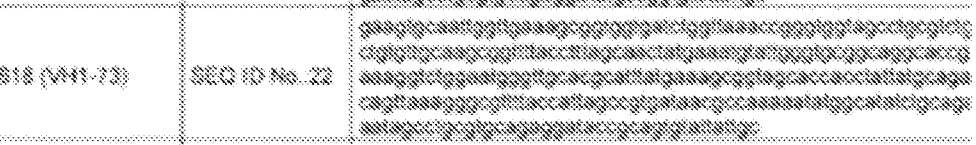
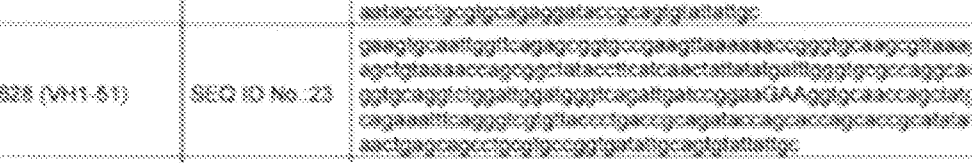
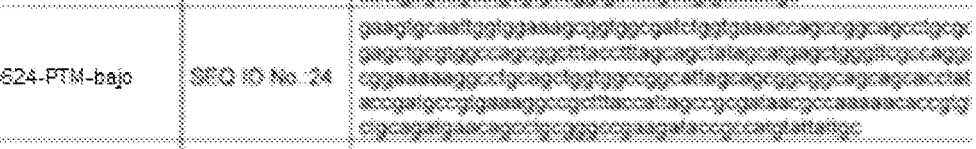
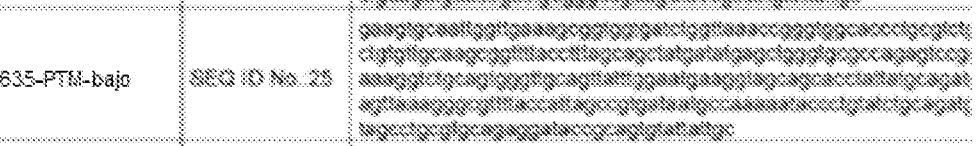
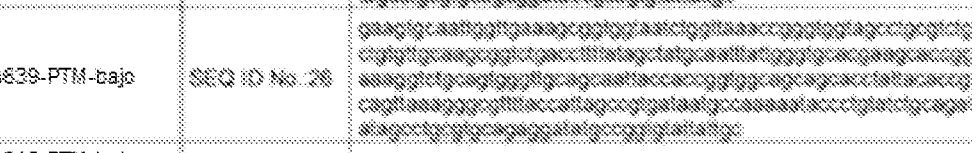
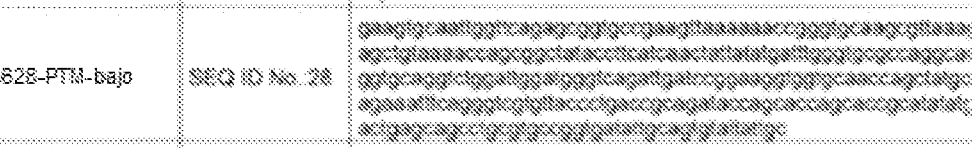
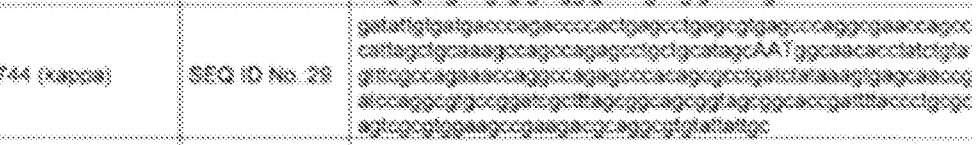
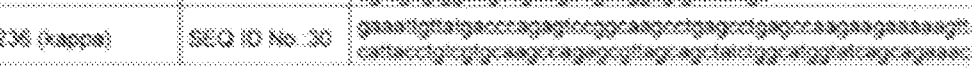
En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que las regiones L-CDR3 de esencialmente todos los miembros de la biblioteca están flanqueadas por sitios de restricción únicos.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca es una biblioteca no sesgada.

**Tabla 1:**

| | # Región variable de línea germinal | SEQ ID No.: | [aa] / ADN |
|---|---|---|---|
| VH (proteína) | Vκ2-4 (VH1-62) | SEQ ID No. 1 | EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFSSYSMSWVRQAPG<br>GLQLVAGINSGGSSTYYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL<br>AEDTAMYYC |
| | Vκ3-8 (VH1-44) | SEQ ID No. 2 | EVQLVESGGDLVKPGGTLRLSCVASGFTFSSYDMSWVRQSPE<br>GLQWVAVIWNDGSSTYYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS<br>AEDTAVYYC |
| | Vκ3-9 (VH1-21) | SEQ ID No. 3 | EVQLVESGGNLVKPGGSLRLSCVASGLTFYSYAIYWVREAPG<br>LQWVANITTDGSSTYYTDAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLR<br>EDMPVYYC |

| | # Región variable de línea germinal | SEQ ID No.: | [aa] / ADN |
|---|---|---|---|
| | Vs618 (VH1-73) | SEQ ID No.: 4 | EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYEMYWVRQAP<br>GLEWVARIYESGSTTYYAEAVKGRFTISRDNAKNMAYLQMNS<br>AEDTAVYYC |
| | Vs628 (VH1-81) | SEQ ID No.: 5 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFINYYMHWVRQAPQ<br>GLDWMGGIDPEDGATSYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSS<br>RAGDAVYYC |
| | Vs624-PTM-bajo | SEQ ID No.: 6 | EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFSSYSMSWVRQAPI<br>GLQLVAGISGGGSSTYYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL<br>AEDTAMYYC |
| | Vs635-PTM-bajo | SEQ ID No.: 7 | EVQLVESGGDLVKPGGTLRLSCVASGFTFSSYDMSWVRQSP<br>GLQWVAVIWNEGSSTYYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS<br>AEDTAVYYC |
| | Vs639-PTM-bajo | SEQ ID No.: 8 | EVQLVESGGNLVKPGGSLRLSCVASGLTFYSYAIYWVHEAPG<br>LQWVAAITTGGSSTYYTDAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLR<br>EDMPVYYC |
| | Vs618-PTM-bajo | SEQ ID No.: 9 | equal to SEQ ID No.: 4 |
| | Vs628-PTM-bajo | SEQ ID No.: 10 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFINYYMHWVRQAPQ<br>GLDWMGGIDPEDGATSYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSS<br>RAGDAVYYC |
| VL (proteína) | Vs744 | SEQ ID No.: 11 | DVVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNGNTYLYWFRQ<br>PGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEI<br>GVYYC |
| | Vs738 | SEQ ID No.: 12 | EIVMTQSPASLSLSQEERVTITCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA<br>KLLIYDTSNRATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYC |
| | Vs388 | SEQ ID No.: 13 | SYVLTQLPSVSVTLRQTARITCGGDSIGSKNVYWYQQKLGQA<br>LIIYDDSSRPSGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYYC |
| | Vs321 | SEQ ID No.: 14 | QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSNYPGWYQQTI<br>RAPRTIIYRTSSRPSGVPNRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEAD<br>YC |
| | Vs843 | SEQ ID No.: 15 | QSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSSSNVGYGNYVGWYQQLI<br>TGPRTLIYRSSSRPSGVPDRFSGSRSGSTATLTISGLQAEDEA<br>YC |
| | Vs323 | SEQ ID No.: 16 | QSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSSSNIGRQYVGWYQQLPG<br>GPRTLIYGNSNRPSGVPDRFSGSRSGSTATLTISGLQAEDEAD<br>YC |
| | Vs744-PTM-bajo | SEQ ID No.: 17 | DVVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSSGNTYLYWFRQ<br>GQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDV<br>VYYC |
| | Vs323-PTM-bajo | SEQ ID No.: 18 | QSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSSSNIGRQYVGWYQQLPG<br>GPRTLIYGGSNRPSGVPDRFSGSRSGSTATLTISGLQAEDEAD<br>C |
| | Vs624 (VH1-82) | SEQ ID No.: 19 | gaggtgcaattggtggaatcgggtggcgatctggtgaaacctggcggatcgctgcgc<br>ctgtcgtgcgccgcgtcgggattcactttcagcagctacgcgatgtcgtgggtgcgccaggcg<br>ccgggaaaaggcctggagtgggtgggcgcgattAATagcggtggcagcgcgacctta<br>acgatgccgtgaaaggccgcttcaccatcagccgcgataacgccaaaaacaccgtgt<br>cgctgcagatgaacagcctgcgcgcggaagacaccgcggtgtattac |

| | # Región variable de línea germinal | SEQ ID No.: | [aa] / ADN |
|---|---|---|---|
| VH (ADN) | Vs835 (VH1-46) | SEQ ID No. 20 |  |
| | Vs839 (VH1-21) | SEQ ID No. 21 |  |
| | Vs818 (VH1-73) | SEQ ID No. 22 |  |
| | Vs828 (VH1-61) | SEQ ID No. 23 |  |
| | Vs824-PTM-bajo | SEQ ID No. 24 |  |
| | Vs835-PTM-bajo | SEQ ID No. 25 |  |
| | Vs839-PTM-bajo | SEQ ID No. 26 |  |
| | Vs818-PTM-bajo | SEQ ID No. 27 | Equal to SEQ ID No. 22 |
| | Vs828-PTM-bajo | SEQ ID No. 28 |  |
| VL (ADN) | Vs744 (kappa) | SEQ ID No. 29 |  |
| | Vs236 (kappa) | SEQ ID No. 30 |  |

| | # Región variable de línea germinal | SEQ ID No.: | [aa] / ADN |
|---|---|---|---|
| | | | [illegible] |
| | Vs365 (lambda) | SEQ ID No.:31 | [illegible] |
| | Vs321 (lambda) | SEQ ID No.:32 | [illegible] |
| | Vs843 (lambda) | SEQ ID No.:33 | [illegible] |
| | Vs323 (lambda) | SEQ ID No.:34 | [illegible] |
| | Vs744-PTM-bajo | SEQ ID No.:35 | [illegible] |
| | Vs323-PTM-bajo | SEQ ID No.:36 | [illegible] |

**Tabla 2**

| | | | |
|---|---|---|---|
| J (FR4) (Proteína) | JH | SEQ ID No.: 37 | WGQGTLVTVSS |
| | Jkappa | SEQ ID No.: 38 | FGAGTKVELK |
| | Jlambda | SEQ ID No.: 39 | FGGGTQLTVL |
| J (FR4) (ADN) | JH | SEQ ID No.: 40 | tggggccagggcaccctggttaccgtctcgagc |
| | Jkappa | SEQ ID No.: 41 | tttggcgcaggtaccaaagtggaactgaaa |
| | Jlambda | SEQ ID No.: 42 | tttggcggtggtacccagctgaccgtgctg |

**Tabla 3**

| ID | Tipo de cadena ligera | VH | VL | Expresión Fab [mg/l] | Monómero Fab [%] | Expresión de IgG [mg/l] | Contenido de monómero de IgG [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1A | kappa | Vs624-PTM-bajo | Vs744-PTM-bajo | 0,7 | 89,3 | 3,0 | 97 |

(continuación)

| ID | Tipo de cadena ligera | VH | VL | Expresión Fab [mg/l] | Monómero Fab [%] | Expresión de IgG [mg/l] | Contenido de monómero de IgG [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1B | kappa | Vs635-PTM-bajo | Vs744-PTM-bajo | 0,3 | | 12,1 | 97,1 |
| 1C | kappa | Vs639-PTM-bajo | Vs744-PTM-bajo | 0,4 | | 0,0 | |
| 1D | kappa | Vs618 | Vs744-PTM-bajo | 0,3 | | 15,1 | 85,7 |
| 1E | kappa | Vs628-PTM-bajo | Vs744-PTM-bajo | 0,2 | | 0,0 | |
| 2A | kappa | Vs624-PTM-bajo | Vs236 | 2,8 | 89,8 | 12,1 | 98 |
| 2B | kappa | Vs635-PTM-bajo | Vs236 | 0,6 | 83,9 | 54,3 | 98,6 |
| 2C | kappa | Vs639-PTM-bajo | Vs236 | 0,2 | | 0,0 | |
| 2D | kappa | Vs618 | Vs236 | 2,2 | 89,1 | 57,3 | 98,2 |
| 2E | kappa | Vs628-PTM-bajo | Vs236 | 1,1 | 90,6 | 3,0 | 98,3 |
| 3A | lambda | Vs624-PTM-bajo | Vs365 | 1,9 | 85,9 | 15,1 | 97,9 |
| 3B | lambda | Vs635-PTM-bajo | Vs365 | 1,4 | 90,0 | 57,3 | 98,5 |
| 3C | lambda | Vs639-PTM-bajo | Vs365 | 0,3 | | 0,0 | |
| 3D | lambda | Vs618 | Vs365 | 3,7 | 94,8 | 69,4 | 98,7 |
| 3E | lambda | Vs628-PTM-bajo | Vs365 | 1,1 | 89,1 | 6,0 | 98,4 |
| 4A | lambda | Vs624-PTM-bajo | Vs321 | 6,1 | 93,0 | 0,0 | |
| 4B | lambda | Vs635-PTM-bajo | Vs321 | 3,0 | 94,6 | 3,0 | |
| 4C | lambda | Vs639-PTM-bajo | Vs321 | 0,2 | | 0,0 | |
| 4D | lambda | Vs618 | Vs321 | 6,3 | 93,0 | 3,0 | 98,2 |

(continuación)

| ID | Tipo de cadena ligera | VH | VL | Expresión Fab [mg/l] | Monómero Fab [%] | Expresión de IgG [mg/l] | Contenido de monómero de IgG [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4E | lambda | Vs628-PTM-bajo | Vs321 | 0,6 | 71,3 | 0,0 | |
| 5A | lambda | Vs624-PTM-bajo | Vs843 | 4,5 | 95,3 | 0,0 | |
| 5B | lambda | Vs635-PTM-bajo | Vs843 | 1,6 | 93,9 | 3,0 | 98,6 |
| 5C | lambda | Vs639-PTM-bajo | Vs843 | 0,3 | | 0,0 | |
| 5D | lambda | Vs618 | Vs843 | 6,3 | 91,9 | 6,0 | 98,7 |
| 5E | lambda | Vs628-PTM-bajo | Vs843 | 0,6 | 83,5 | 0,0 | |
| 6A | lambda | Vs624-PTM-bajo | Vs323-PTM-bajo | 4,8 | 93,2 | 0,0 | |
| 6B | lambda | Vs635-PTM-bajo | Vs323-PTM-bajo | 3,2 | 95,3 | 3,0 | 99,4 |
| 6C | lambda | Vs639-PTM-bajo | Vs323-PTM-bajo | 0,3 | | 0,0 | |
| 6D | lambda | Vs618 | Vs323-PTM-bajo | 7,3 | 92,5 | 6,0 | 98,4 |
| 6E | lambda | Vs628-PTM-bajo | Vs323-PTM-bajo | 0,6 | 77,7 | 0,0 | |

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Generación de una biblioteca sintética de anticuerpos caninos**

La presente divulgación proporciona una colección o biblioteca de anticuerpos candidatos que comprenden pares de genes VH y VL caninos presentes en el repertorio inmunitario canino, en la que cada miembro comprende secuencias génicas de línea germinal o secuencias de línea germinal modificadas (denominados PTM-bajos) para eliminar sitios de modificación postraduccional (PTM) desfavorables para optimizar aún más la expresión y las propiedades biofísicas del anticuerpo. Los pares VH y VL seleccionados para su incorporación a la biblioteca comprenden propiedades biofísicas ventajosas que aumentan la probabilidad de que cada uno de los anticuerpos seleccionados de la biblioteca sea convenientemente desarrollable. Para determinar la composición de la biblioteca hubo que evaluar múltiples criterios. Los siguientes ejemplos describen los criterios evaluados, los procedimientos de evaluación y los resultados.

**Ejemplo 1.1: Selección de secuencias candidatas de las líneas germinales VL y VH**

En una primera etapa, se identificaron los genes de línea germinal VH y VL predominantes del repertorio inmune canino de la literatura (Bao et al. Vet Immunol Immunopathol. 2010 Sep 15;137 (1-2):64-75; Steiniger et al. Mol Immunol. 2014 May; 59(1):71-8) y mediante el análisis de secuencias de anticuerpos caninos reordenadas disponibles en Bao et al. (Vet Immunol Immunopathol. 2010 Sep;137(1-2):64-75), Braganza et al. (Vet Immunol Immunopathol. 2011 Jan;139(1):27-40), Vgenerepertoire.org and AbYsis (http://www.bioinf.org.uk/abysis2.7/index.html). En total, se analizaron más de 300 secuencias VH caninas reordenadas, >100 Vkappa y >150 Vlambda. Dado que se ha reconocido que para una interacción antígeno-anticuerpo eficaz podría ser beneficioso un amplio espacio de conformaciones, se tuvo cuidado de incluir secuencias estructuralmente diferentes en la selección final. De este modo,

en una segunda etapa, se identificaron genes VH y VL (Vkappa y Vlambda) estructuralmente diversos del repertorio de la línea germinal canina mediante análisis de distancias. Los resultados se muestran en las figuras 1, 2 y 3.

Las regiones V con sitios flanqueantes para enzimas de restricción fueron sintetizadas por GeneArt con las secuencias CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) (SEQ ID No.:43) y kappa CDR-L3 (QQHYTTPPT) (SEQ ID No: 44 del anticuerpo hu4D5-8 y CDR-L3 tipo lambda (QSYDSSLSGW) (SEQ ID No: 45) y las secuencias de las proteínas de la línea germinal canina JH, Jkappa y Jlambda (véase la tabla 2), respectivamente. GeneArt se encargó de optimizar el uso de codones en relación con la expresión en E. coli (evitando codones humanos poco frecuentes), de evitar regiones con un contenido de GC muy alto (>80 %) o muy bajo (<30 %) y de eliminar posibles motivos de secuencias cis, tales como motivos de inestabilidad del ARN y sitios crípticos donantes y aceptores de empalme. Los genes sintetizados de la cadena pesada de la región V de la Ig cubrían las secuencias completas desde los primeros aminoácidos (EVQL) (SEQ ID No.:46) que contienen un sitio de restricción 5' único para MfeI hasta el sitio de restricción 3' único para XhoI localizado en el límite de la región V con la C. Corriente arriba del CDR-H3, se incorporó un sitio de restricción para BssHII con el fin de permitir la posterior inserción de la biblioteca CDR-H3. Las secuencias del gen de la cadena ligera de las regiones Ig Vkappa y Vlambda variaron desde el primer sitio de restricción único 5' para NdeI situado en la secuencia líder ompA modificada hasta los sitios de restricción 3' para Acc65I/KpnI en la región marco (FR4). Corriente arriba de la CDR-L3, se incorporó un sitio de restricción para BbsI con el fin de permitir la posterior inserción de la biblioteca CDR-L3. A continuación, se combinaron pares de genes VH/VL a partir de 5 genes VH, 4 Vlambda y 2 Vkappa seleccionados, creando 30 combinaciones VH/VL. Los 5 constructos de la región VH (constructos A - E) se clonaron junto con 2 constructos de la región Vkappa (#1 - #2) o 4 constructos de la región Vlambda (#3 - #6) en el vector de visualización de fagos pCaDis18 (fusión genética gill - Fab) (véase la figura 9) y el vector de expresión Fab bacteriano pCaBx_FH (véase la figura 10) utilizando procedimientos estándar de biología molecular. Se verificó la secuencia de todas las combinaciones seleccionadas. Por último, estos 30 pares VH/VL se compararon experimentalmente para identificar el subconjunto de pares de genes VH/VL con propiedades biofísicas favorables. Se evaluaron al menos las siguientes propiedades: 1) Análisis *in silico* : a) longitud de CDR1+CDR2; b) motivos de modificación postraduccional (PTM); c) la presencia de metioninas en las CDR; d) la presencia de cisteínas; 2) tasas de visualización de Fab; 3) tasas y rendimientos de expresión de Fab e IgG; 4) contenido de monómeros de Fab e IgG.

**Ejemplo 1.2: Diseño de H-CDR3 caninas**

Los sitios de contacto más estrecho entre el anticuerpo y el antígeno son las regiones determinantes complementarias (CDR) del anticuerpo. H-CDR3 y L-CDR3 desempeñan un papel fundamental en la unión al antígeno, de este modo la variabilidad se introdujo principalmente en estas dos CDR. Para todas las demás CDR, se utilizaron secuencias de línea germinal o secuencias de línea germinal modificadas con motivos PTM eliminados.

En general, se evitaron los residuos de cisteína en el diseño de las CDR3 porque los residuos de cisteína pueden participar en la formación de enlaces disulfuro que unen covalentemente un aglutinante con la diana de paneo o en la formación de homodímeros de anticuerpos. Es poco probable que estos aglutinantes sean selectivos.

Se compilaron las secuencias de anticuerpos reordenadas y se analizaron las H-CDR3 y L-CDR3 para el diseño de CDR3 caninas. El análisis de la H-CDR3 se realizó para todas las secuencias reordenadas independientemente de la familia de la línea germinal VH, ya que la H-CDR3 está codificada independientemente de la VH por los segmentos D y J.

El análisis de distribución de aminoácidos confirmó como se ha descrito que los motivos de aminoácidos más frecuentes en la CDR3 VH canina son CAR/CAK en la posición IMGT 104-106 (posiciones Chothia 92-94) -, y para las posiciones IMGT 115-117 (posiciones Chothia 100x-94) el motivo FDY(Steiniger Molecular Immunology 59 (2014) 71-78).

La distribución de aminoácidos observada se modificó ligeramente para finalizar el diseño de las longitudes H-CDR3 de 5 a 16 aminoácidos en la biblioteca (véanse las tablas 4 a 15), por ejemplo, evitando por completo las cisteínas, reduciendo el uso de triptófano y evitando los sitios de glicosilación (NxS, NxT).

**Tabla 4**

| L=5aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 100x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 0 | 90 | 0 |

(continuación)

| L=5aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 100x | 101 | 102 |
| E | | | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22,5 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 5**

| L= 6aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 100x | 101 | 102 |

(continuación)

| L= 6aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 100x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22,5 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 6**

| L= 7aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 100x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 15 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22,5 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 7**

| L= 8aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7, 5 | 15 | 15 | 15 | 12,5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22, 5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7, 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2, 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17,5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 8**

| L= 9aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 15 | 15 | 12,5 | 12,5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22,5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17,5 | 17,5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 9**

| L= 10a a | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100a | 100x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7 5 | 15 | 15 | 15 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22 5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 1 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17,5 | 17,5 | 17,5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 1 | 1 | 1 5 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 10**

| L= 11a a | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 9 3 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100 a | 100 b | 100 x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 15 | 15 | 12, 5 | 12, 5 | 12,5 | 12,5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22, 5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17, 5 | 17, 5 | 17,5 | 17,5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 10 0 | 10 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 11**

| L= 12aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100 a | 100 b | 100 c | 100 x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 15 | 15 | 12, 5 | 12, 5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22, 5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17,5 | 17,5 | 17,5 | 17,5 | 17,5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 12**

| L=13 a a | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100 a | 100 b | 100 c | 100 d | 100 x | 10 1 | 10 2 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 15 | 15 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22,5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 55 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |

(continuación)

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L= 13a a | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100 a | 100 b | 100 c | 100 d | 100 x | 10 1 | 10 2 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17,5 | 17,5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 10 0 | 10 0 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 13**

| L= 14a a | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 10 0 | 100 a | 100 b | 100 c | 100 d | 100 e | 100 x | 10 1 | 10 2 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 10 0 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 15 | 15 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22, 5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 10 0 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| suma | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 10 0 | 10 0 |
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 14**

| L= 15 aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 10 0 | 100a | 100b | 100c | 100d | 100e | 100f | 100x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 10 0 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7, 5 | 15 | 15 | 15 | 12,5 | 12,5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12, 5 | 12,5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 12,5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 10 0 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17,5 | 17,5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 17, 5 | 17,5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| suma | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 | 10 0 |

**(continuación)**

| L= 15 aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| # de aa | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 |

**Tabla 15**

| L= 16 aa | | | mezcla H1 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H2 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H3 | mezcla H4 | mezcla H5 | mezcla H6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100a | 100b | 100c | 100d | 100e | 100f | 100f | 100x | 101 | 102 |
| D | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 |
| E | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| K | | | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| R | | 100 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| H | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| T | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| S | | | 7,5 | 15 | 15 | 15 | 12, 5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12, 5 | 0 | 0 | 0 |
| N | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | | | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| G | | | 22, 5 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 5 | 5 | 0 |
| A | 100 | | 7,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| C | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | | | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| V | | | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| I | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 0 | 5 |
| L | | | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 15 | 0 | 5 |
| M | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| F | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 0 | 5 |
| Y | | | 5 | 10 | 10 | 10 | 17, 5 | 17, 5 | 17,5 | 17,5 | 17,5 | 17,5 | 17,5 | 17, 5 | 5 | 0 | 70 |
| W | | | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de a a | 1 | 1 | 15 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 8 | 3 | 7 | |

**Ejemplo 1.3. Diseño de L-CDR3**

El análisis de la L-CDR3 se realizó para todas las secuencias reordenadas independientemente de la familia de la línea germinal de VL, ya que la L-CDR3 está codificada en parte independientemente de la línea germinal por el segmento J. Basándose en el análisis de secuencias Vkappa caninas reordenadas, se descubrió que en aproximadamente el 85 % de todas las secuencias Vkappa aparece una longitud L-CDR3 de Kabat de 9 aminoácidos. De este modo, la longitud de la L-CDR3 de Kabat para las regiones Vkappa de la biblioteca se fijó en una longitud de 9 aminoácidos (véase la tabla 16). En el caso de las secuencias Vlambda, la longitud L-CDR3 de Kabat más frecuente es de 11 aa (60 %), seguida de 10 aa (30 %). De este modo, las longitudes de las L-CDR3 de Kabat para las regiones Vlambda de la biblioteca se fijaron en las longitudes de 10 y 11 aminoácidos (véanse las tablas 17 y 18). La distribución de aminoácidos observada se modificó ligeramente para finalizar el diseño de la L-CDR3 en la biblioteca, por ejemplo, evitando por completo las cisteínas y los sitios de glucosilación (NxS, NxT).

**Tabla 16**

| **L=9aa** | mezcla K9 | mezcla K2 | mezcla K3 | mezcla K4 | mezcla K5 | mezcla K6 | mezcla K7 | mezcla K8 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | **89** | **90** | **91** | **92** | **93** | **94** | **95** | **96** | **97** |
| D | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| E | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| K | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| R | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 10 | 0 |
| H | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 0 | 4 | 0 |
| T | 0 | 0 | 5 | 25 | 5 | 10 | 2 | 0 | 100 |
| S | 0 | 0 | 12,5 | 5 | 15 | 10 | 2 | 4 | 0 |
| N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | 70 | 95 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| G | 27,5 | 0 | 25 | 5 | 5 | 5 | 0 | 4 | 0 |
| A | 0 | 0 | 12,5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 94 | 20 | 0 |
| V | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 |
| I | 0 | 0 | 5 | 10 | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 |
| L | 0 | 0 | 5 | 10 | 5 | 5 | 2 | 5 | 0 |
| M | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 20 | 0 | 10 | 0 |
| Y | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 10 | 0 | 15 | 0 |

(continuación)

| **L=9aa** | mezcla K9 | mezcla K2 | mezcla K3 | mezcla K4 | mezcla K5 | mezcla K6 | mezcla K7 | mezcla K8 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | **89** | **90** | **91** | **92** | **93** | **94** | **95** | **96** | **97** |
| W | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 0 | 10 | 0 |
| | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 3 | 2 | 13 | 14 | 14 | 15 | 4 | 13 | 1 |

**Tabla 17**

| **L=10 aa** | mezcla L1 | mezcla L2 | mezcla L3 | mezcla L4 | mezcla L5 | mezcla L6 | mezcla L7 | mezcla L8 | mezcla L9 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | **89** | **90** | **91** | **92** | **93** | **94** | **95** | **95a** | **96** | **97** |
| D | 0 | 0 | 0 | 60 | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| E | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 10 | 0 | 0 |
| R | 0 | 0 | 2,5 | 0 | 10 | 10 | 5 | 10 | 2,5 | 0 |
| H | 0 | 0 | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| T | 0 | 15 | 2,5 | 7,5 | 15 | 20 | 7,5 | 12,5 | 12,5 | 0 |
| S | 55 | 50 | 0 | 0 | 25 | 30 | 12,5 | 20 | 5 | 0 |
| N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G | 5 | 0 | 0 | 5 | 10 | 15 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| A | 10 | 25 | 2,5 | 15 | 5 | | 5 | 5 | 10 | 0 |
| C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 15 | 0 |
| V | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 10 | 100 |
| I | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 0 |
| L | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 2,5 | 30 | 2,5 | 2,5 | 0 |
| M | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

(continuación)

| **L=10 aa** | mezcla L1 | mezcla L2 | mezcla L3 | mezcla L4 | mezcla L5 | mezcla L6 | mezcla L7 | mezcla L8 | mezcla L9 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | **89** | **90** | **91** | **92** | **93** | **94** | **95** | **95a** | **96** | **97** |
| F | 0 | 0 | 10 | 0 | 5 | 0 | 5 | 5 | 7,5 | 0 |
| Y | 0 | 0 | 30 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 10 | 0 |
| W | 0 | 0 | 47,5 | 0 | 2,5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 4 | 5 | 7 | 7 | 13 | 10 | 12 | 13 | 13 | 1 |

**Tabla 18**

| **L=11 aa** | mezcla L1 | mezcla L2 | mezcla L3 | mezcla L4 | mezcla L5 | mezcla L6 | mezcla L7 | mezcla L8 | mezcla L10 | mezcla L9 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | **89** | **90** | **91** | **92** | **93** | **94** | **95** | **95a** | **95b** | **96** | **97** |
| D | 0 | 0 | 0 | 60 | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| E | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| R | 0 | 0 | 2,5 | 0 | 10 | 10 | 5 | 10 | 5 | 2,5 | 0 |
| H | 0 | 0 | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| T | 0 | 15 | 2,5 | 7,5 | 15 | 20 | 7,5 | 12,5 | 15 | 12,5 | 0 |
| S | 55 | 50 | 0 | 0 | 25 | 30 | 12,5 | 20 | 10 | 5 | 0 |
| N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Q | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G | 5 | 0 | 0 | 5 | 10 | 15 | 10 | 10 | 25 | 10 | 0 |
| A | 10 | 25 | 2,5 | 15 | 5 | | 5 | 5 | 15 | 10 | 0 |
| C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 15 | 0 |
| V | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 7,5 | 10 | 100 |
| I | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 5 | 0 |

(continuación)

| **L=11 aa** | mezcla L1 | mezcla L2 | mezcla L3 | mezcla L4 | mezcla L5 | mezcla L6 | mezcla L7 | mezcla L8 | mezcla L10 | mezcla L9 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pos | **89** | **90** | **91** | **92** | **93** | **94** | **95** | **95a** | **95b** | **96** | **97** |
| L | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 2,5 | 30 | 2,5 | 5 | 2,5 | 0 |
| M | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F | 0 | 0 | 10 | 0 | 5 | 0 | 5 | 5 | 2,5 | 7,5 | 0 |
| Y | 0 | 0 | 30 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 5 | 10 | 0 |
| W | 0 | 0 | 47,5 | 0 | 2,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| | | | | | | | | | | | |
| suma | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| # de aa | 4 | 5 | 7 | 7 | 13 | 10 | 12 | 13 | 11 | 13 | 1 |

**Ejemplo 1.4: Diversificación de la biblioteca canina**

La biblioteca de anticuerpos caninos generada en el presente estudio comprende regiones L-CDR3 y H-CDR3 diversificadas. Los casetes de la biblioteca CDR3 se generaron mediante la tecnología Slonomics, que permite la incorporación controlada únicamente de codones deseables en los casetes CDR3, evitando la introducción de codones de cisteína y de parada (Van den Brulle et al. Biotechniques. 2008 Sep;45(3):340-3). La secuenciación de clones no seleccionados tras la generación de la biblioteca indicó que la incidencia global de mutaciones indeseables del ADN, deleciones, inserciones y desplazamientos de marco de los casetes L-CDR3 y H-CDR3 era baja.

Se piensa que las propiedades bioquímicas y biofísicas de los dominios VH y VL dependen también de su secuencia H-CDR3 y L-CDR3, respectivamente y por lo tanto se decidió introducir una secuencia particular H-CDR3, kappa L-CDR3 y lambda L-CDR3 en los genes caninos seleccionados VH, Vkappa y Vlambda, respectivamente con el propósito de la comparación VH/VL. La secuencia H-CDR3 (WGGDGFYAMDY) (SEQ ID No.:43) y kappa L-CDR3 (QQHYTTPPT) (SEQ ID No.:44) se derivaron del anticuerpo hu4D5-8 (Carter et al. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:4285-9;) y una L-CDR-3 tipo lambda (QSYDSSLSGVV) (SEQ ID No.:45), todos los cuales se habían aplicado anteriormente para la evaluación de genes maestros humanos (Knappik et al., 2000, J Mol Biol 296, 57-86, Ewert et al., J Mol Biol 2003; 325:531-53).

**Ejemplo 1.5 Vectores de visualización y expresión**

Se utilizaron los vectores pMORPH18 (Rauchenberger et al. J Biol Chem. 2003 Oct 3;278 (40):38194-205) y pMORPHx30 (Prassler et al. J Mol Biol. 2011 Oct 14;413(1):261-78) como plantillas para la generación de la nueva visualización Fab pCaDis18 y el vector de expresión Fab pCaBx, respectivamente, con las siguientes modificaciones. Para ambos vectores, las secuencias líderes ompA corriente arriba de las secuencias codificantes de la cadena ligera de Ig se modificaron en su C-terminal para introducir los sitios de restricción NdeI, respectivamente, para asegurar la autenticidad de los N-terminales de las secuencias de las proteínas VL y VH y para permitir la conveniente subclonación de los fragmentos Fab en los vectores IgG pCaMx. Además, se construyó un conjunto de vectores de expresión de IgG de mamífero. Las secuencias de IgG canina CH1 y Clambda & Ckappa fueron sintetizadas por GeneArt (optimización de codones H. sapiens). El constructo CH se clonó en un pM4_Vector que contenía un Kan stuffer (pCaMx_Stuffer). Las dos secuencias Clambda & Ckappa de codón optimizado se clonaron en un vector genérico Geneart. (pMA-T_CaMin kappa pMA-T_CaMin lambda). La conversión de IgG se realizó utilizando los procedimientos más avanzados de biología molecular.

**Ejemplo 2. Caracterización biofísica de los pares VH/VL caninos**

Los siguientes ejemplos describen procedimientos y resultados de la caracterización biofísica de pares VH/VL caninos.

**Ejemplo 2.1 Preparación de fagos**

Las combinaciones de anticuerpos sintetizadas en el ejemplo 1.1, se clonaron en el vector de visualización Fab pCaDis para pruebas funcionales. Los vectores contenían combinaciones de 5 genes maestros VH y 6 VL, lo que da 30 combinaciones posibles. Se generó una placa maestra llenando cada uno de los pocillos con medio 2xYT/Cam/1 % de glucosa e inoculándolos con clones individuales de los 30 constructos de anticuerpos generadas. La placa se incubó durante toda la noche a 37 °C mientras se agitaba. Al día siguiente, la placa maestra se almacenó en una concentración final de glicerol al 15 % y se congeló a -80 °C. Para las preparaciones de fagos, se inocularon 2xYT/Cam/1 % de glucosa con reservas de glicero derivados de las placas maestras y se incubaron mientras se agitaban a 400 rpm hasta alcanzar una OD600 nm de 0,5. A continuación, las células se infectaron con el fago ayudante VCSM 13 y se incubaron a 37 ° x durante 30 min sin agitación y después durante otros 30 min mientras se agitaba a 400 rpm. Las bacterias se centrifugaron y se volvieron a suspender en medio 2xYT con 34 µg/ml de cloranfenicol, 50 µg/ml de kanamicina y 0,25 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (2× YT/Cam/Kan/IPTG) y se incubaron a 22 °C durante 18-20 h para la producción de fagos. Los sobrenadantes que contenían los fagos con Fab se transfirieron a nuevos tubos y los fagos se precipitaron utilizando 1/5 del volumen de sobrenadante de PEG/NaCl (20 % de PEG 6000, 2,5 M NaCl en ddH2O). Tras centrifugar y eliminar los sobrenadantes, las pellas de fagos se volvieron a suspender en PBS estéril. Los títulos de fagos se determinaron mediante la medición de la absorbancia a OD268 nm (Nanodrop, peqlab) y se confirmaron mediante la siembra en dilución limitadora de células TG1F+ de E. coli infectadas en placas LB/Cam/Gluc.

**Ejemplo 2.2 Tasas de visualización de fagos Fab por Western Blot**

Los sobrenadantes de fago preparados como en el ejemplo 2.1 se utilizaron para determinar las tasas de visualización de Fab en partículas de fago utilizando técnicas de transferencia Western.

Alrededor de 1E+09 fagos en un volumen total de 10 µl se mezclaron con colorante de carga 4x LDS y se calentaron durante 10 min a 80 °C. Se utilizó un gel (NUPAGE 4-12 % de Bis-Tris-Gel, 1,0 mm x 12 pocillos, Novex, Cat. NP0322Box) se colocó en una cámara de ejecución y la cámara se llenó con tampón de ejecución MES 1x (preparado a partir de NUPAGE MES SDS Running Buffer, 20x, Invitrogen). Las muestras y el marcador se cargaron en el gel y se realizó la electroforesis durante 35 min a 200 V. Se retiró el gel, se lavó con ddH20 y se realizó la transferencia de proteínas a la membrana Western Blot con una apertura iBlot. Posteriormente, la membrana se bloqueó con leche en polvo al 10 % en TBS-T a RT durante 1,5 h. La membrana se lavó rápidamente con TBS-T y se incubó con un anticuerpo anti-pIII (ratón anti-pIII, MoBiTec, Cat: PSKAN3; 1:1000 en TBS-T 3 % de MP) durante 1 h a RT. Tras 3x5 min de lavado, la membrana se incubó con IgG-HRP anti-ratón (Anti-mouse IgG-HRP (P9), Jackson Immuno Research, Código 115-036-062; 1:10'000 en TBS-T, 3 % de MP) durante 1 h a RT. La membrana se lavó 3 × 5 min con TBS-T y se registró la quimioluminiscencia con el Biorad Imager (Program: "blot colorimetric" para mostrar el marcador proteico y "blot chem" para mostrar la detección HRP) tras la adición del sustrato HRP (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Cat. WBKLS0500). En el western blot anti-pIII, se determinaron las cantidades relativas de pIII(fl) y pIII(ct)-Fd. Los resultados se muestran en la figura 4.

La visualización eficiente de los miembros de la biblioteca en partículas de fago es un requisito previo para el éxito de las selecciones de visualización de fagos. Se utilizó Western-Blot para determinar la eficacia de visualización de las combinaciones caninas VH/VL en formato Fab. Los datos indican que esencialmente todas las combinaciones caninas VH/VL probadas se visualizaron en fagos. Los resultados se muestran en la figura 5.

**Ejemplo 2.3 Expresión relativa de Fab ELISA**

Los clones de las 30 combinaciones VH/VL clonadas en pCaBx se inocularon en medio de crecimiento (2x YT/Cam/IPTG/0,1 % de glucosa) y se incubaron a 37 °C agitando a 400 rpm durante ~ 3 h hasta que los cultivos se volvieron ligeramente turbios. Posteriormente, los cultivos se incubaron durante la noche a 22 °C agitando antes de que las células se lisaran utilizando el tampón BEL (24,7 mg/ml de ácido bórico, 18,7 mg/ml de NaCl, 1,48 mg/ml de EDTA, 2,5 mg/ml de lisozima, ajustado a pH 8,0 con 10 M de NaOH) y se bloquearon con leche en polvo al 10 % en PBS. La expresión de Fab se determinó mediante ELISA utilizando un anticuerpo de captura específico contra el fragmento F(ab')2 canino (anticuerpo de conejo Fab'2 anti IgG de perro no conjugado; LifeSpan BioSciences, LS-C69729) y un anticuerpo de detección contra el fragmento F(ab')2 anti IgG de perro conjugado con AP (anticuerpo de cabra anti IgG de perro (H+L)-fosfatasa alcalina, Sigma SAB3700097) con AttoPhos (Roche). Los niveles relativos de expresión Fab se calcularon dividiendo la señal de un par Fab VH/VL respectivo por la señal del anticuerpo quimérico humano/canino de referencia. Más del 85 % de los pares Fab VH/VL probados mostraron una expresión relativa de al menos 0,5 de los controles. Los clones Lambda tenían, en promedio, los niveles de expresión Fab relativos más altos. Los resultados se muestran en la figura 6.

**Ejemplo 2.4 Producción a escala exploratoria de fragmentos Fab etiquetados con His**

La expresión de los fragmentos Fab codificados por el vector de expresión bacteriano en células F de E. coli TG1 se llevó a cabo en cultivos de matraz agitado utilizando 500 ml de medio 2xYT suplementado con 0,1 % de glucosa y 34 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos se agitaron hasta que la OD600 alcanzó un valor de 0,5. La expresión de Fab se indujo agregando IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranósido) y se siguió cultivando durante 20 h. Las células se cosecharon y se disgregaron utilizando lisozima. Los fragmentos Fab etiquetados con His6 (SEQ ID No.:47) se aislaron mediante IMAC (BioRad) y se eluyeron utilizando imidazol. El intercambio de tampones a 1x PBS de Dulbecco (pH

7,2) se realizó utilizando columnas "PD10" (GE Healthcare). Las muestras se filtraron estérilmente (0,2 µm). Las concentraciones de proteínas se determinaron por espectrofotometría UV. La pureza de las muestras se analizó en SDS-PAGE desnaturalizante no reductor al 15 %. El % de monómero de los fragmentos Fab purificados que representan cada uno de los 30 pares VH/VL caninos se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La SEC se realizó en un sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare Europe GmbH, Friburgo, Alemania). Para la separación se utilizó una columna Superdex75 HR 10/30 (GE Healthcare Europe GmbH, Friburgo, Alemania). Para cada muestra se cargaron 10 µl de proteína en la columna, se realizó la separación a un caudal de 0,05 ml/min y se registró analizando la absorción UV a 260 y 280 nm. El tampón de funcionamiento estaba compuesto por Gibco D-PBS, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). Los resultados se muestran en la figura 7.

Como se muestra en la figura 6 y la figura 7, todas las combinaciones caninas VH/VL probadas, se expresan en E. coli y la tasa de expresión del Fab purificado oscila entre 0,2 mg/l y 8 mg/l de cultivo bacteriano (barras, eje y izquierdo). Además, la caracterización del material aislado reveló que la mayor parte del Fab VH/VL canino purificado se encontraba en forma monomérica por encima del 85 %. Esto indica su utilidad para el desarrollo de anticuerpos caninos utilizando la biblioteca.

**Ejemplo 2.5 Producción exploratoria a escala de IgG y determinación del contenido en monómeros**

Las células eucariotas HKB11 se transfectaron con ADN de vector de expresión de mamíferos pCaMx que codifica las cadenas tanto pesada como ligera de IgG. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron el día 3 o 6 tras la transfección y se sometieron a cromatografía de afinidad estándar con proteína A (MabSelect SURE, GE Healthcare). El intercambio de tampones se realizó a 1x PBS de Dulbcecco (pH 7,2) y las muestras se filtraron estérilmente (tamaño de poro de 0,2 µm).

Las concentraciones de proteínas se determinaron por espectrofotometría UV y las purezas de IgG se analizaron en condiciones desnaturalizantes, reductoras y no reductoras utilizando CE-SDS (LabChip GXII, Perkin Elmer). El % de monómero de IgG1 purificada que representaba cada uno de los 30 pares VH/VL caninos se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La HP-SEC se realizó en un sistema 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, se realizó la separación a un caudal de 0,5 ml/min y se registró analizando la absorción UV a 280 nm. El tampón de funcionamiento estaba compuesto por Gibco D-PBS, pH 7,4 (Invitrogen, Paisley, EE.UU.). Los resultados se muestran en la figura 8 (puntos, eje Y derecho). Los constructos con tasas de expresión suficientes mostraron excelentes contenidos de monómero >95 %. Para la selección de las combinaciones VH/VL utilizadas como andamiaje para la clonación de bibliotecas y la diversificación de CDR3, se tuvieron en cuenta tanto los datos de producción de Fab como de IgG.

**Ejemplo 2.6 Tasa relativa de visualización de fagos Fab ELISA**

La visualización del Fab en el fago M13 se determinó mediante ELISA utilizando un anticuerpo anti-M13 (Amersham) para capturar el fago a través de la proteína de cubierta principal pVIII y utilizando un anticuerpo anti-Fd (el sitio de unión) que se une al Fab visualizado. Se detectaron diluciones apropiadas de los sobrenadantes de fagos y de las muestras de referencia con un conjugado de peroxidasa anti-M13 (Amersham) y QuantaBlu™ (Pierce). Los cálculos de las tasas de visualización relativas para cada muestra se realizaron dividiendo el título de anti-Fd por el título de anti-M13. Los títulos se obtuvieron a partir de curvas de calibración de preparaciones de fagos de referencia.

**Ejemplo 2.7 Estabilidad del Fab a temperatura ELISA**

Diluciones apropiadas de lisados bacterianos se exponen a diferentes temperaturas (0 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C) durante 45 min. Las moléculas Fab intactas se detectan mediante ELISA utilizando un anticuerpo de captura anti-6×His (SEQ ID No.:47) (R&D Systems) y un anticuerpo de detección anti-Ig canina etiquetada con AP con AttoPhos (Roche).

**Ejemplo 2.8. Determinación de la estabilidad térmica de la IgG purificada**

La estabilidad térmica de la IgG se determina mediante fluorometría diferencial de barrido (DSF). La DSF es una técnica basada en tintes de fluorescencia que monitoriza el desdoblamiento térmico (punto de fusión) de una proteína de interés. Los cambios en la fluorescencia de un colorante hidrofóbico que interactúa con las cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos de la proteína desplegada se controlan a lo largo de una rampa de temperatura. Se utilizan los siguientes materiales: Colorante fluorescente Sypro Orange (Sigma, #S5692); placas PCR iCycler iQ, 96 pocillos (Biorad, #2239441); sellador adhesivo Microseal B (Biorad #MSB-1001); almohadilla óptica de 96 pocillos (Biorad, #ADR3296); y termociclador iCycler iQ5 (Biorad). Se agrega Sypro Orange diluido a cada pocillo de una placa PCR iCycler iQ de 96 pocillos, y se prueban las muestras a una concentración final de al menos 0,1 mg/ml. La temperatura se explora de 20 °C a 95 °C a una tasa de calentamiento de 60 °C/h, y la temperatura de desdoblamiento se calcula analizando el punto medio de la transición de fluorescencia.

**Ejemplo 2.9. Cálculo del punto isoeléctrico (pI)**

Se calcula el punto isoeléctrico de cada IgG. Los procedimientos para determinar el pI de una proteína son conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden utilizarse las siguientes herramientas: http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html; Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, California).

**Ejemplo 3. Selección y caracterización de anticuerpos**

Para confirmar la eficacia del diseño de la biblioteca, ésta se prueba contra diversos antígenos. A continuación, los anticuerpos seleccionados se someten a pruebas en formatos Fab e IgG para determinar sus características de capacidad de desarrollo, tales como: a) tasa de visualización de Fab; b) rendimiento de expresión de Fab, c) estabilidad térmica de Fab; d) estabilidad sérica de Fab; e) Fab SEC % de monómero; f) rendimiento de expresión de IgG; g) estabilidad térmica de IgG; h) estabilidad sérica de IgG; i) IgG SEC % de monómero; j) punto isoeléctrico (pI) de IgG; k) estabilidad térmica en los formatos Fab o IgG antes y después de la exposición al ácido mediante fluorometría diferencial de barrido; l) absorción en los formatos Fab o IgG antes y después de la exposición al ácido; m) radio molecular y % de polidispersidad antes y después de la exposición al ácido medidos mediante dispersión dinámica de la luz; y/o n) tinción de partículas en los formatos Fab o IgG. Además, se determina la afinidad por el antígeno en formato Fab.

**Ejemplo 3.1 Preparación de fagos**

Los fagos que muestran los respectivos pares VH/VL en formato Fab se prepararon del siguiente modo. Para cada preparación de fagos de la biblioteca, se inocularon 80 ml de medio 2x YT/Cam/Glc con bacterias de la reserva de glicerol de la biblioteca correspondiente, lo que dio como resultado una OD600 nm de 0,2 - 0,3. Los cultivos se agitaron durante 30 - 90 min a 120 rpm y 37 °C hasta alcanzar una OD600 nm de 0,45 - 0,55. A continuación, se agregaron fagos ayudantes con una multiplicidad de infección de 10 al cultivo bacteriano, seguido de una incubación durante 45 min a 37 °C sin agitación y después durante 45 min a 37 °C agitando a 120 rpm. Se centrifugaron las bacterias y se desechó el sobrenadante que contenía fagos ayudantes. Las bacterias infectadas por fagos se volvieron a suspender en 400 ml de medio 2x YT/Cam/Kan/IPTG y se incubaron durante la noche a 22 °C con agitación a 120 rpm. Al día siguiente, se peletizaron las bacterias del cultivo de una noche y se recogió el sobrenadante que contenía los fagos con Fab. La precipitación de los fagos se realizó agregando 1/5 de volumen total de PEG/NaCl previamente enfriado al sobrenadante que contenía los fagos. La muestra se incubó durante al menos 30 minutos en hielo hasta que se hicieron visibles nubes de fagos precipitantes. Los fagos precipitados se centrifugaron y se volvieron a suspender en 20 ml de PBS. La muestra se hizo girar lentamente para obtener una suspensión homogénea y los restos bacterianos residuales se peletizaron y desecharon. A partir del sobrenadante que contenía los fagos, éstos se precipitaron de nuevo utilizando PEG/NaCl. Por último, el precipitado de fagos se volvió a suspender en PBS, se transfirió a un tubo estéril y se agitó lentamente para obtener una suspensión homogénea. Los títulos de los fagos se determinaron mediante titulación puntual y ELISA. Los títulos de los fagos y los niveles de visualización de los fragmentos Fab expresados por el vector de visualización pCaDis (mostrado en la figura 9) y presentados en el fago se evaluaron para cada preparación individual de fago mediante ELISA y/o Westernblot (véase el ejemplo 2.6) Para ELISA se utilizaron dos anticuerpos diferentes para la captura: (1) se utilizó el anticuerpo anti-M13 (Amersham #27-9420-01), ya que captura las partículas de fago a través de la proteína de cubierta principal g8p; por lo tanto, se puede determinar el título de fago. (2) se utilizó anti-canina-Fab'2 (LS Bio, #LS-C69729), que se une al Fab visualizado; por lo tanto, sólo se capturaron los fagos que mostraban Fabs. Para (1) y (2) se utilizaron curvas de referencia distintas. Como anticuerpo de detección se utilizó un anti-M13 monoclonal (dirigido contra la proteína de cubierta principal del fago M13, g8p) conjugado con HRP. La evaluación de los datos ELISA se completó del siguiente modo: se crean curvas de calibración y se calculan los títulos de los sobrenadantes de fagos y del control. Para cada muestra, el título en anti-Fd se divide por el título en anti-M13 (anti-pVIII), la proporción resultante es la tasa de visualización relativa.

**Ejemplo 3.2. Selección de anticuerpos**

La selección por visualización de fagos puede realizarse como se describe a continuación o por otro procedimiento conocido para un experto en la técnica. Por ejemplo, se realizan estrategias de paneo en paralelo (por ejemplo, paneo en solución, paneo de captura de Fc, paneo directo en fase sólida) para maximizar la posibilidad de identificar diversos anticuerpos de unión con las características biofísicas deseadas. Pueden elegirse diversas proteínas solubles como antígenos modelo para la validación de la biblioteca (por ejemplo, la lisozima). El cribado de colección contra el antígeno modelo se realiza en un paneo de solución basado en microesferas con el antígeno acoplado covalentemente a Dynabeads magnéticas mediante la formación de enlaces amida a grupos de ácido carboxílico (Dynal/Invitrogen Prod. no. 143.06) como se describe a continuación. La selección contra el antígeno modelo también puede realizarse con una estrategia de paneo de captura de Fc, descrita a continuación.

**Ejemplo 3.2.1. Paneo de la solución a base de microesferas**

El antígeno modelo y las microesferas de carboxilo recubiertas de BSA de control (Dynal) se bloquean con polvo de leche al 5 % + 0,1 % de Tween20 en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente (TA) antes de la incubación con los fagos preadsorbidos durante 2 horas a RT. Tras varias etapas de lavado, los fagos unidos se eluyen y amplifican infectando células TG1F+ para la siguiente ronda de selección. Tras 3 rondas de selección, se aísla el ADN del fagémido pCaDis (mostrado en la figura 9) y los fragmentos que codifican Fab se escinden mediante digestión de restricción con XbaI y EcoRI y se ligan al vector de expresión pCaBx (mostrado en la figura 10) y se transforman en

TG1 F- de E. coli . A continuación, los cultivos infectados se siembran en placas grandes de LB/Cam/Gluc y se dejan crecer a 34 °C. Se aíslan clones individuales y se comprueba el rendimiento de la expresión Fab y la unión al antígeno mediante ELISA. La expresión de Fab se detecta incubando extractos celulares que contengan Fab en una placa ELISA recubierta de anticuerpo de conejo F(ab)'2 anti-IgG de perro (LifeSpan BioSciences, LS-C69729), seguida de detección con anticuerpo de cabra de fosfatasa alcalina anti-IgG de perro (H+L) (Sigma, SAB37000097). La especificidad del antígeno se comprueba, por ejemplo, mediante el cribado de Fab que contenga extractos celulares sobre antígeno modelo acoplado-Carboxylbeads y BSA acoplado-Carboxylbeads (Dynal) con una tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT®) para ensayos basados en microesferas (Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System / PE Biosystems). Los "aciertos primarios" se definen como Fabs que dan lugar a una señal de fluorescencia media FMAT de al menos 5 veces por encima del fondo que se establece en un valor de 200. La especificidad para el antígeno modelo se confirma en un ELISA secundario con el antígeno modelo como antígeno cognado y un antígeno irrelevante como antígeno de control negativo. Se seleccionan aproximadamente 50 - 100 clones de cada sub-biblioteca, sub-biblioteca-mezcla o de la biblioteca total para secuenciar la región CDR3 de las cadenas pesada y ligera y estimar la diversidad de secuencias de los anticuerpos de unión a antígenos modelo. Los resultados de la secuenciación muestran que las bibliotecas construidas contienen un repertorio diverso de aglutinantes de antígenos modelo. La caracterización de la unión mediante ELISA muestra que los anticuerpos aislados son altamente específicos para el antígeno modelo de interés, sin reactividad cruzada con el antígeno de control irrelevante, lo que demuestra la utilidad de la biblioteca para la investigación biomédica y la generación de anticuerpos terapéuticos altamente específicos.

**Ejemplo 3.2.2. Paneo de captura de Fc**

Se realizan tres rondas de paneo de captura de Fc en fase sólida utilizando proteína modelo recombinante humana etiquetada con Fc inmovilizada por captura con anti-IgG Fc específico de cabra (Jackson; Cat. 109-005-098) o anti-IgG humano de ratón Fc específico (Jackson; Cat. 209-005-098) en placas Maxisorp (Nunc). Antes de cada ronda de selección, los fagos se bloquean con 0,1 mg/ml de inmunoglobulina humana, de cabra y de ratón en PBS/5 % de leche, /5 % de BSA/ 0,1 % de Tween durante 2 h a RT. Tras varias etapas de lavado, los fagos unidos se eluyen y amplifican infectando células TG1F+ para la siguiente ronda de selección. Tras la tercera ronda de selección, se aísla el ADN del fagémido pCaDis (mostrado en la figura 9) y se extirpan los fragmentos que codifican Fab mediante digestión de restricción con Xbal y EcoRI y se ligan al vector de expresión pCaBx (mostrado en la figura 10) y se transforman en TG1F-. A continuación, los cultivos infectados se siembran en placas grandes de LB/Cam/Gluc y se dejan crecer a 34 °C. Se aíslan clones individuales y se comprueba el rendimiento de la expresión Fab y la unión al antígeno mediante ELISA. La expresión de Fab se detecta como se ha descrito anteriormente. La especificidad del antígeno se comprueba mediante un cribado ELISA con extractos celulares que contienen Fab sobre el antígeno modelo proteína_Fc capturado mediante un anticuerpo IgG antihumano de cabra (Jackson; Cat. 109-005-098) recubiertas en placas MaxiSorp. Los "aciertos primarios" se definen como Fabs que dan lugar a una señal ELISA de al menos 5 veces por encima del fondo. La especificidad para la proteína modelo_Fc se confirma en un ELISA secundario de captura de Fc con el antígeno modelo_Fc como antígeno cognado y una proteína irrelevante_Fc como antígeno de control negativo.

Se seleccionan aproximadamente 50 - 100 clones para secuenciar las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera con el fin de estimar la diversidad de secuencias de los anticuerpos de unión antígeno_Fc modelo. Los resultados de la secuenciación confirman que las bibliotecas construidas contienen un repertorio diverso de aglutinantes. La caracterización de la unión mediante ELISA muestra que los anticuerpos aislados son altamente específicos para el antígeno modelo de interés, sin reactividad cruzada con el antígeno de control irrelevante, lo que demuestra la utilidad de la biblioteca para la investigación biomédica y la generación de anticuerpos terapéuticos altamente específicos.

**Ejemplo 3.3. Pruebas de capacidad de desarrollo**

Los anticuerpos o fragmentos específicos para los antígenos se prueban en formatos Fab e IgG para características de capacidad de desarrollo, tales como, estabilidad térmica en formato Fab, afinidad en formato Fab, pI en formato IgG, rendimiento de expresión en formato IgG, estabilidad térmica en formato IgG, y % de monómero en formato IgG como se determina por SEC por los procedimientos divulgados en la presente memoria o por otros procedimientos conocidos para un experto en la técnica. Las pruebas de estabilidad térmica en formatos Fab e IgG se completan como se describe en los ejemplos 2.7 y 2.8. La determinación de pI se completa como se describe en el ejemplo 2.9. El rendimiento de expresión en formato IgG se completa como se describe en el ejemplo 2.5. El % de monómero en formato IgG determinado por SEC se completa como se describe en el ejemplo 2.5.

**Ejemplo 3.4. Determinación Biacore KD (afinidad) mediante la configuración de captura de antígeno en formato Fab**

La unión de fracciones Fab monoméricas (analizadas por SEC analítica; Superdex75, Amersham Pharmacia) al antígeno capturado se analiza del siguiente modo: En un chip CM5 (Biacorel GE Healthcare) se inmoviliza covalentemente un anticuerpo de captura de etiqueta antiantígeno apropiado mediante química EDC/NHS. Las mediciones cinéticas se realizan mediante la captura del antígeno y la posterior inyección de seis concentraciones diferentes de Fab (dilución seriada 2n). Después de cada ciclo, el chip sensor se regenera. Se utiliza una inyección en blanco de tampón de funcionamiento para la doble referenciación. Todos los sensorgramas se ajustan utilizando el

software de evaluación BIA 3.2 (Biacore/ GE Healthcare), para determinar las constantes de velocidad kon y koff, que se utilizan para calcular la KD.

La afinidad también puede determinarse por titulación de equilibrio en solución como se describe en Haenel et al (2005) Analytical Biochemistry 339(1): 182-184.

Los anticuerpos aislados muestran valores de afinidad que van desde KD subnanomolares a nanomolares de un solo dígito, lo que confirma que los anticuerpos de unión fuerte contra el antígeno modelo de interés pueden aislarse fácilmente de la biblioteca.

**Ejemplo 4. Análisis de redundancia de bibliotecas y QC por NGS**

La calidad de la biblioteca se evaluó mediante secuenciación de amplicones de alto rendimiento utilizando el instrumento MiSeq (Illumina ~ 1 millón de secuencias por muestra VL / VH) según los manuales proporcionados por el fabricante.

**Ejemplo 4.1. Generación de amplicones**

En resumen, los amplicones VL o VH de muestras individuales (por ejemplo: ADN plasmídico derivado de la biblioteca clonada) se produjeron mediante PCR (1 min 98 °C, 15 ciclos de 98 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s y 72 °C durante 15 s, 72 °C durante 5 min, 15 ng de ADN plantilla, 0,4 µM de cada cebador, 200 µM de dNTP y 1 U de Phusion polimerasa (NEB)) utilizando cebadores específicos de fusión de amplicones.

**Ejemplo 4.2. NGS utilizando un protocolo TruSeq / Nextera XT modificado**

Los amplicones que contenían los adaptadores universales Nextera fueron amplificados por PCR como se ha descrito anteriormente (primera etapa - adaptador PCR), purificados en gel de agarosa y cuantificados. En una segunda etapa de la PCR (PCR de índice) se agregó una combinación de índices única (índices i5 / i7) al extremo 5'- y 3'- de cada muestra en paralelo (1min 98 °C, 10 ciclos de 98 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s y 72 °C durante 60 s, 72 °C durante 5min, 1 ng de plantilla, 0,4 µM de cebador, 200 µM de dNTP y 0,5 U de Phusion polimerasa).

Los productos de la PCR se purificaron utilizando microesferas AMPure XP (Beckman Coulter) para eliminar fragmentos pequeños, se normalizaron utilizando el kit SequalPrep Normalization Plate (Invitrogen) y se agruparon equimolarmente. El ADN agrupado se desnaturalizó mediante NaOH 0,2N y finalmente se diluyó hasta una concentración de 8 a 10 pM. Se agregó una biblioteca de control (PhiX) al grupo de muestras (5-10 %) y el grupo se cargó en la celda de flujo para la secuenciación. El ciclo de secuenciación por pares se realizó de acuerdo con la Guía del usuario del sistema MiSeq y los manuales de secuenciación del kit de reactivos MiSeq v3 (ciclo 600).

Los resultados de la secuenciación se procesaron directamente, se demultiplexaron, se clasificaron y se generaron archivos fastq utilizando el paquete de software MiSeq proporcionado (SAV1.8, MiSeq Reporter).

**Ejemplo 4.3. Análisis de secuencias**

Las secuencias filtradas por calidad se analizaron posteriormente utilizando un software desarrollado internamente a medida para el procesamiento y análisis de grandes conjuntos de datos de secuenciación. Las secuencias se demultiplexaron y se evaluaron las características de secuencia específicas de la biblioteca, por ejemplo, el tipo de gen V, la longitud de HCDR3 y la distribución de aminoácidos. En resumen, la distribución VH y VL, respectivamente, es la esperada y existe una muy buena correlación entre el diseño y los aminoácidos obtenidos en las posiciones deseadas (Figuras 11, 12 y 13).

**Ejemplo 5. Selección de anticuerpos de visualización de fagos**

Se eligió eGFP (proteína fluorescente verde potenciada) como antígeno modelo para la validación de la biblioteca. Se realizó un paneo en fase sólida seguido de un cribado en ELISA de recubrimiento directo para aislar los ligantes específicos de eGFP de la biblioteca. Se realizaron paneos en fase sólida utilizando eGFP directamente inmovilizada en placas de microtitulación. Antes de cada ronda de selección, los fagos se bloquearon con leche desnatada en polvo al 10 % en PBS. Tras la incubación de los fagos, se realizaron varios lavados con PBST para eliminar los aglutinantes muy débiles/no específicos. Los fagos ligados se eluyeron con un tampón de elución de bajo pH y se amplificaron infectando células TG1F+ para la siguiente ronda de selección. Tras la última ronda de selección, se aisló el ADN del fagémido pCaDis y los fragmentos codificantes de Fab se extirparon mediante digestiones de restricción con XbaI y EcoRI, se ligaron al vector de expresión pCaBx (Figura 10) y se transformaron en TG1F- E. coli. A continuación, los cultivos infectados se sembraron en placas LB/Cam/Gluc y se dejaron crecer durante toda la noche. Se aislaron clones individuales y se comprobó el rendimiento de la expresión Fab y la unión al antígeno mediante ELISA. La expresión de Fab se detectó incubando extractos celulares que contenían Fab en una placa de ELISA recubierta con F(ab)2 de conejo anti-IgG de perro (LSBio, Cat.: LS-C69729), seguido de detección con anticuerpo de conejo específico F(ab)2 anti-IgG de perro conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma, SAB37000097). La especificidad del antígeno se comprobó mediante un cribado ELISA con Fab que contenían extractos celulares de eGFP recubiertos en placas MaxiSorp. Se definieron como aciertos primarios los Fabs que dan lugar a una señal ELISA de al menos 5 veces por

encima del fondo. La especificidad para eGFP se confirmó en un ELISA secundario en un antígeno de control negativo (placa recubierta sólo con proteína de leche).

Se secuenciaron las regiones CDR3 de cadena pesada y ligera de 29, 8 y 58 clones para las sub-bibliotecas 2A/2D, 3A/3D y 3B/6B, respectivamente, con el fin de estimar la diversidad de secuencias de los anticuerpos de unión a eGFP. Los datos de cribado y secuenciación se resumen en la tabla 19. La figura 13 muestra una visualización inmunotransferencia de los resultados del cribado.

**Tabla 19**

| Subcódigo | Cribado | S/B >3-10 | S/B >10 | Hitrato [%] | Secuenciado | Único |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2A/2D | 364 | 139 | 149 | 79 | 29 | 1 |
| 3A/3D | 364 | 20 | 2 | 6 | 8 | 3 |
| 3B/6B | 364 | 54 | 120 | 48 | 58 | 5 |

2A/2D contiene fagos de las subbibliotecas VL/VH (Vs236/Vs624) y VL/VH (Vs236/Vs618)
3A/3D contiene fagos de las subbibliotecas VL/VH (Vs365/Vs624) y VL/VH (Vs365/Vs635)
3B/6B contiene fagos de las subbibliotecas VL/VH (Vs365/Vs618) y VL/VH (Vs323/Vs635)

**Ejemplo 6. Fab ELISA**

Para comparar la unión de clones individuales obtenidos tras selecciones de paneo, se han titulado anticuerpos purificados en formato Fab y se han probado sobre eGFP recubierta en placas Maxisorp con un anticuerpo de conejo de detección específico F(ab)2 anti IgG de perro conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma, SAB37000097). Se ha incluido como referencia un anticuerpo anti-GFP (MOR06391) aislado previamente de la biblioteca HuCAL. Como se ilustra en la figura 15, los anticuerpos aislados directamente de la biblioteca presentan diversas fuerzas de unión, con 6/9 candidatos que muestran características de unión similares o mejores que el anticuerpo de referencia.

**Ejemplo 7. IgG ELISA**

El paneo contra eGFP como antígeno modelo se ha realizado como se describe en el ejemplo 5. Los hits Fab específicos obtenidos tras las selecciones de anticuerpos se convirtieron a formato IgG utilizando procedimientos de biología molecular de última generación y se produjo proteína IgG como se describe en el ejemplo 2.5. La reactividad IgG contra la eGFP se confirmó en un ELISA estándar en fase sólida (Figura 16). La detección de la unión de IgG a la eGFP recubierta en placas Maxisorp se realizó con un anticuerpo de conejo de detección específico F(ab)2 de anti-IgG de perro conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma, SAB37000097). Se ha incluido como referencia un anticuerpo anti-GFP (MOR06391) aislado previamente de la biblioteca HuCAL.

## REIVINDICACIONES

1. Una biblioteca sintética de anticuerpos caninos, en la que dicha biblioteca comprende una o más de las siguientes combinaciones VH/VL: la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:13), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), y la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs323-PTM-bajo (lambda) (SEQ ID No.:18), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs618 (SEQ ID No.:4) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs624-PTM-bajo (SEQ ID No.:6) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs321 (lambda) (SEQ ID No.:14), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs635-PTM-bajo (SEQ ID No.:7) y la región VL Vs236 (kappa) (SEQ ID No.:12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL VS236 (kappa) (SEQ ID No.12), la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL Vs365 (lambda) (SEQ ID No.:13), y la combinación VH/VL de la región VH1 Vs628-PTM-bajo (SEQ ID No.:10) y la región VL Vs843 (lambda) (SEQ ID No.:15).

2. La biblioteca de la reivindicación 1, en la que los sitios de modificación postraduccional (PTM) se eliminan de una o más de las regiones VH de la línea germinal o de las regiones VL de la línea germinal.

3. La biblioteca de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL de dicha biblioteca se visualizan eficazmente a una tasa de visualización de al menos 0,5 Fab por fago.

4. La biblioteca de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL tienen un contenido monomérico de al menos el 85 % cuando se expresan en E. coli en formato Fab.

5. La biblioteca de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que esencialmente todas las combinaciones VH/VL tienen un contenido monomérico de al menos el 90 % cuando se expresan en un sistema de mamífero en formato IgG.

6. La biblioteca de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que todas las combinaciones VH/VL son térmicamente estables.

7. Una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican los miembros de la biblioteca de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

8. Un vector que codifica las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 7.

9. Una célula hospedadora recombinante que comprende las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 7 o el vector de la reivindicación 8.

10. Un procedimiento para aislar un anticuerpo específico para un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) poner en contacto la biblioteca de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 con un antígeno;

(b) eliminar los miembros de la biblioteca que no se unen al antígeno; y

(c) recuperar los miembros de la biblioteca unidos al antígeno.

FIGURA 1

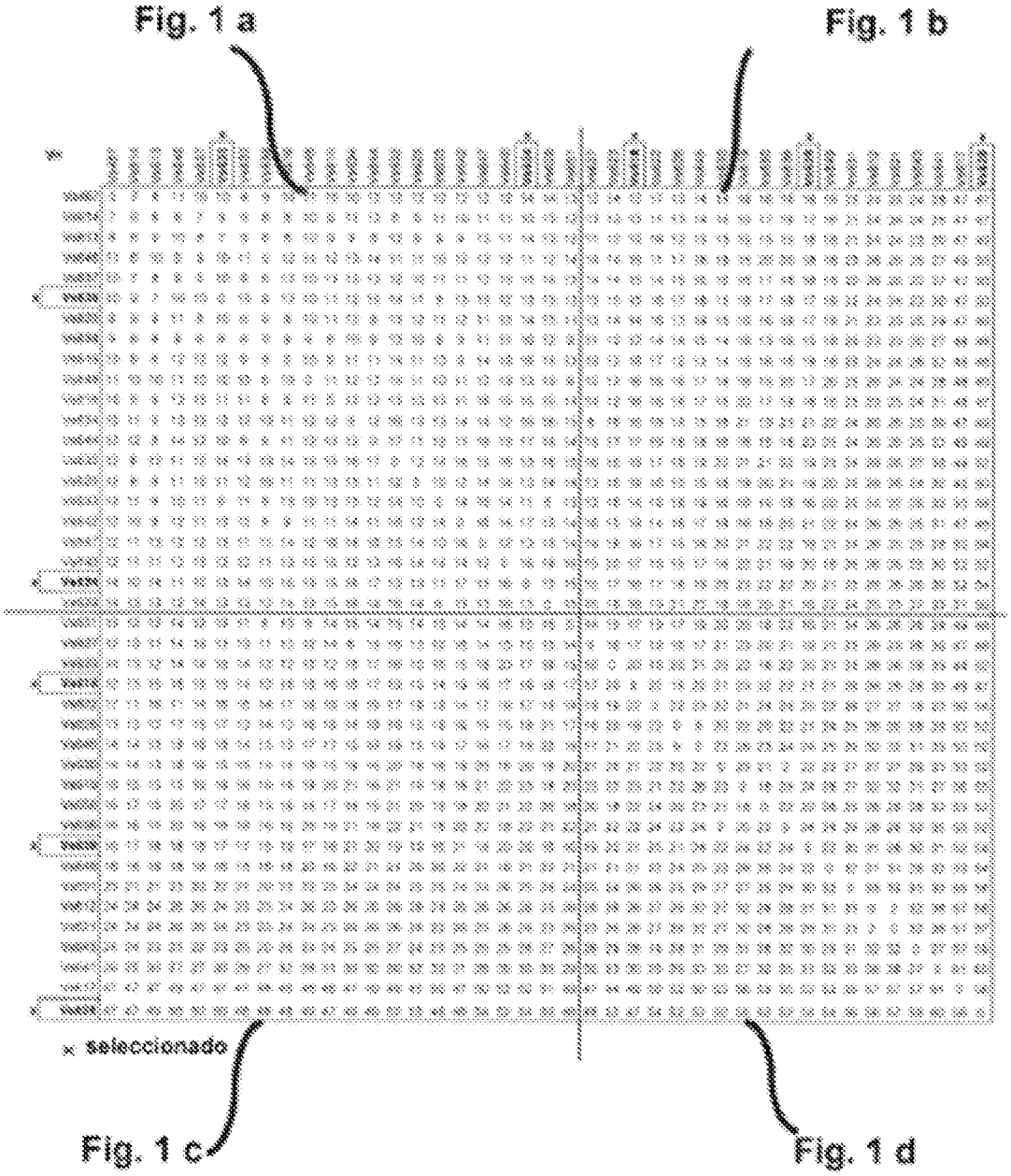
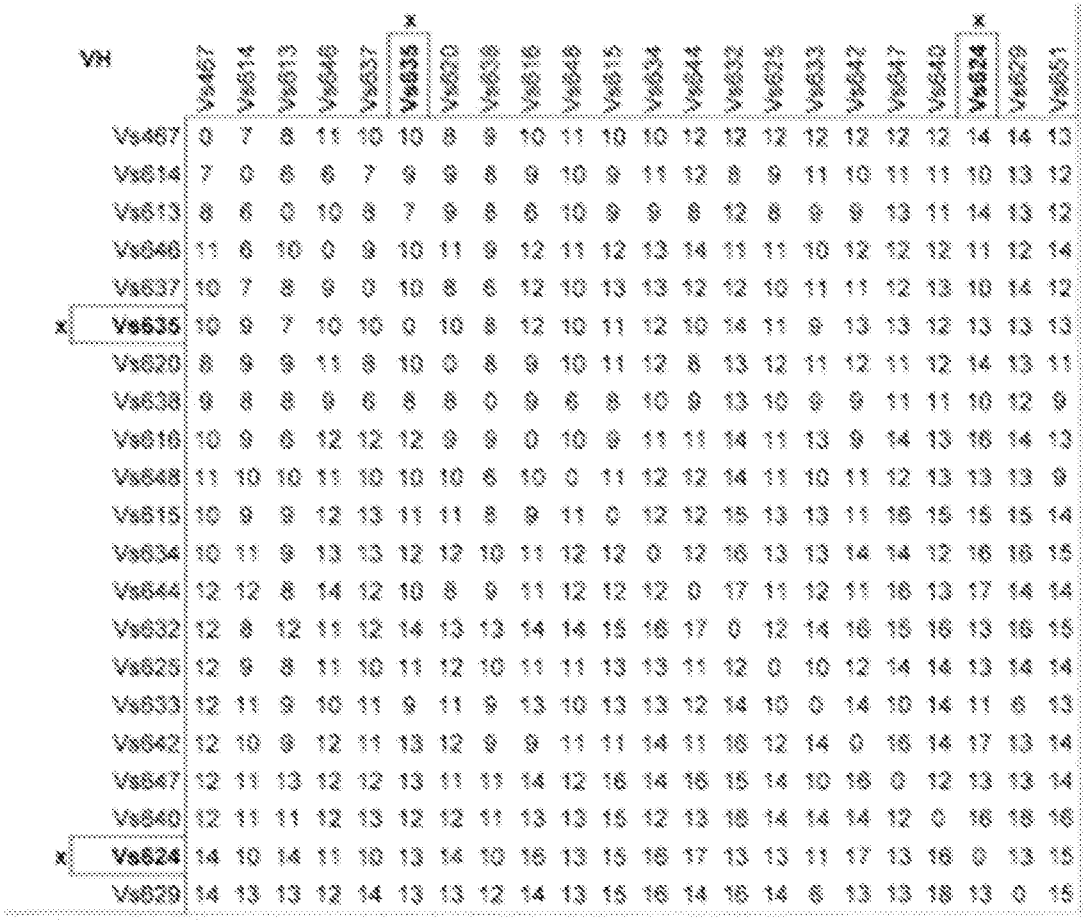


**FIGURA 1a**



| VH | Vs467 | Vs614 | Vs613 | Vs646 | Vs637 | x Vs635 | Vs620 | Vs638 | Vs616 | Vs648 | Vs615 | Vs634 | Vs644 | Vs632 | Vs626 | Vs633 | Vs642 | Vs647 | Vs640 | x Vs624 | Vs629 | Vs651 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vs467 | 0 | 7 | 8 | 11 | 10 | 10 | 8 | 9 | 10 | 11 | 10 | 10 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 14 | 14 | 13 |
| Vs614 | 7 | 0 | 8 | 8 | 7 | 9 | 9 | 8 | 9 | 10 | 9 | 11 | 12 | 8 | 9 | 11 | 10 | 11 | 11 | 10 | 13 | 12 |
| Vs613 | 8 | 6 | 0 | 10 | 8 | 7 | 9 | 8 | 8 | 10 | 9 | 9 | 8 | 12 | 8 | 8 | 9 | 13 | 11 | 14 | 13 | 12 |
| Vs646 | 11 | 8 | 10 | 0 | 9 | 10 | 11 | 9 | 12 | 11 | 12 | 13 | 14 | 11 | 11 | 10 | 12 | 12 | 12 | 11 | 12 | 14 |
| Vs637 | 10 | 7 | 8 | 9 | 0 | 10 | 8 | 8 | 12 | 10 | 13 | 13 | 12 | 12 | 10 | 11 | 11 | 12 | 13 | 10 | 14 | 12 |
| x Vs635 | 10 | 9 | 7 | 10 | 10 | 0 | 10 | 8 | 12 | 10 | 11 | 12 | 10 | 14 | 11 | 9 | 13 | 13 | 12 | 13 | 13 | 13 |
| Vs620 | 8 | 9 | 9 | 11 | 8 | 10 | 0 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 8 | 13 | 12 | 11 | 12 | 11 | 12 | 14 | 13 | 11 |
| Vs638 | 9 | 8 | 8 | 9 | 8 | 8 | 8 | 0 | 9 | 8 | 8 | 10 | 9 | 13 | 10 | 9 | 9 | 11 | 11 | 10 | 12 | 9 |
| Vs616 | 10 | 9 | 8 | 12 | 12 | 12 | 9 | 9 | 0 | 10 | 9 | 11 | 11 | 14 | 11 | 13 | 9 | 14 | 13 | 16 | 14 | 13 |
| Vs648 | 11 | 10 | 10 | 11 | 10 | 10 | 10 | 8 | 10 | 0 | 11 | 12 | 12 | 14 | 11 | 10 | 11 | 12 | 13 | 13 | 13 | 9 |
| Vs615 | 10 | 9 | 9 | 12 | 13 | 11 | 11 | 9 | 9 | 11 | 0 | 12 | 12 | 15 | 13 | 13 | 11 | 16 | 15 | 15 | 15 | 14 |
| Vs634 | 10 | 11 | 9 | 13 | 13 | 12 | 12 | 10 | 11 | 12 | 12 | 0 | 12 | 16 | 13 | 13 | 14 | 14 | 12 | 16 | 16 | 15 |
| Vs644 | 12 | 12 | 8 | 14 | 12 | 10 | 8 | 9 | 11 | 12 | 12 | 12 | 0 | 17 | 11 | 12 | 11 | 16 | 13 | 17 | 14 | 14 |
| Vs632 | 12 | 8 | 12 | 11 | 12 | 14 | 13 | 13 | 14 | 14 | 15 | 16 | 17 | 0 | 12 | 14 | 16 | 15 | 16 | 13 | 16 | 15 |
| Vs626 | 12 | 9 | 8 | 11 | 10 | 11 | 12 | 10 | 11 | 11 | 13 | 13 | 11 | 12 | 0 | 10 | 12 | 14 | 14 | 13 | 14 | 14 |
| Vs633 | 12 | 11 | 9 | 10 | 11 | 9 | 11 | 9 | 13 | 10 | 13 | 13 | 12 | 14 | 10 | 0 | 14 | 10 | 14 | 11 | 6 | 13 |
| Vs642 | 12 | 10 | 9 | 12 | 11 | 13 | 12 | 9 | 9 | 11 | 11 | 14 | 11 | 16 | 12 | 14 | 0 | 16 | 14 | 17 | 13 | 14 |
| Vs647 | 12 | 11 | 13 | 12 | 12 | 13 | 11 | 11 | 14 | 12 | 16 | 14 | 16 | 15 | 14 | 10 | 16 | 0 | 12 | 13 | 13 | 14 |
| Vs640 | 12 | 11 | 11 | 12 | 13 | 12 | 12 | 11 | 13 | 13 | 15 | 12 | 13 | 16 | 14 | 14 | 14 | 12 | 0 | 16 | 16 | 16 |
| x Vs624 | 14 | 10 | 14 | 11 | 10 | 13 | 14 | 10 | 16 | 13 | 15 | 16 | 17 | 13 | 13 | 11 | 17 | 13 | 16 | 0 | 13 | 15 |
| Vs629 | 14 | 13 | 13 | 12 | 14 | 13 | 13 | 12 | 14 | 13 | 15 | 16 | 14 | 16 | 14 | 6 | 13 | 13 | 16 | 13 | 0 | 15 |

**FIGURA 1b**

| VH | Vs627 | Vs623 | x Vs618 | Vs622 | Vs626 | Vs645 | Vs630 | Vs619 | Vs650 | Vs636 | x Vs639 | Vs649 | Vs631 | Vs612 | Vs621 | Vs643 | Vs641 | Vs617 | x Vs628 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vs467 | 12 | 14 | 12 | 17 | 13 | 14 | 14 | 18 | 16 | 16 | 16 | 18 | 23 | 24 | 24 | 24 | 29 | 47 | 47 |
| Vs614 | 13 | 13 | 13 | 11 | 13 | 14 | 14 | 15 | 17 | 16 | 17 | 16 | 21 | 24 | 24 | 24 | 25 | 47 | 47 |
| Vs613 | 11 | 12 | 15 | 16 | 12 | 13 | 13 | 15 | 15 | 15 | 18 | 18 | 21 | 24 | 24 | 23 | 30 | 47 | 49 |
| Vs646 | 14 | 14 | 16 | 11 | 17 | 18 | 18 | 15 | 20 | 20 | 18 | 18 | 23 | 26 | 26 | 25 | 27 | 49 | 50 |
| Vs637 | 14 | 14 | 15 | 14 | 15 | 16 | 16 | 16 | 17 | 18 | 18 | 18 | 20 | 26 | 26 | 22 | 27 | 47 | 50 |
| x **Vs635** | 13 | 15 | 15 | 16 | 17 | 18 | 15 | 18 | 17 | 18 | 17 | 16 | 22 | 24 | 24 | 23 | 30 | 47 | 50 |
| Vs620 | 13 | 14 | 14 | 16 | 13 | 14 | 15 | 16 | 16 | 18 | 17 | 18 | 21 | 23 | 23 | 25 | 29 | 47 | 48 |
| Vs638 | 11 | 12 | 12 | 14 | 14 | 15 | 14 | 18 | 13 | 16 | 15 | 18 | 20 | 23 | 23 | 20 | 27 | 48 | 48 |
| Vs616 | 13 | 12 | 18 | 17 | 12 | 13 | 14 | 18 | 16 | 16 | 19 | 18 | 23 | 24 | 24 | 26 | 32 | 46 | 48 |
| Vs648 | 12 | 12 | 16 | 16 | 16 | 17 | 18 | 18 | 15 | 20 | 17 | 20 | 23 | 26 | 24 | 24 | 28 | 48 | 49 |
| Vs615 | 14 | 12 | 16 | 16 | 16 | 17 | 15 | 20 | 17 | 18 | 18 | 16 | 23 | 23 | 23 | 24 | 31 | 48 | 47 |
| Vs634 | 6 | 16 | 16 | 18 | 14 | 15 | 18 | 21 | 19 | 21 | 21 | 22 | 24 | 26 | 26 | 25 | 30 | 47 | 49 |
| Vs644 | 15 | 17 | 17 | 19 | 18 | 18 | 16 | 16 | 15 | 18 | 20 | 21 | 24 | 26 | 26 | 25 | 32 | 49 | 49 |
| Vs632 | 16 | 16 | 19 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 21 | 22 | 19 | 21 | 24 | 26 | 26 | 27 | 30 | 49 | 52 |
| Vs625 | 13 | 16 | 19 | 18 | 15 | 15 | 18 | 19 | 20 | 21 | 19 | 20 | 25 | 26 | 26 | 24 | 32 | 46 | 50 |
| Vs633 | 12 | 16 | 14 | 18 | 18 | 19 | 16 | 18 | 19 | 18 | 16 | 20 | 25 | 24 | 22 | 25 | 32 | 50 | 48 |
| Vs642 | 16 | 15 | 19 | 14 | 16 | 17 | 18 | 18 | 18 | 20 | 21 | 22 | 24 | 26 | 26 | 25 | 31 | 47 | 48 |
| Vs647 | 14 | 18 | 16 | 17 | 15 | 16 | 20 | 21 | 22 | 22 | 18 | 21 | 24 | 26 | 25 | 25 | 28 | 50 | 54 |
| Vs640 | 15 | 20 | 17 | 19 | 15 | 17 | 16 | 22 | 21 | 18 | 20 | 18 | 26 | 26 | 26 | 25 | 30 | 52 | 52 |
| x **Vs624** | 15 | 17 | 18 | 17 | 18 | 19 | 20 | 23 | 22 | 22 | 20 | 21 | 25 | 26 | 26 | 26 | 30 | 52 | 54 |
| Vs629 | 15 | 18 | 18 | 19 | 21 | 22 | 18 | 18 | 20 | 21 | 16 | 22 | 24 | 25 | 23 | 27 | 33 | 51 | 50 |

**FIGURA 1c**

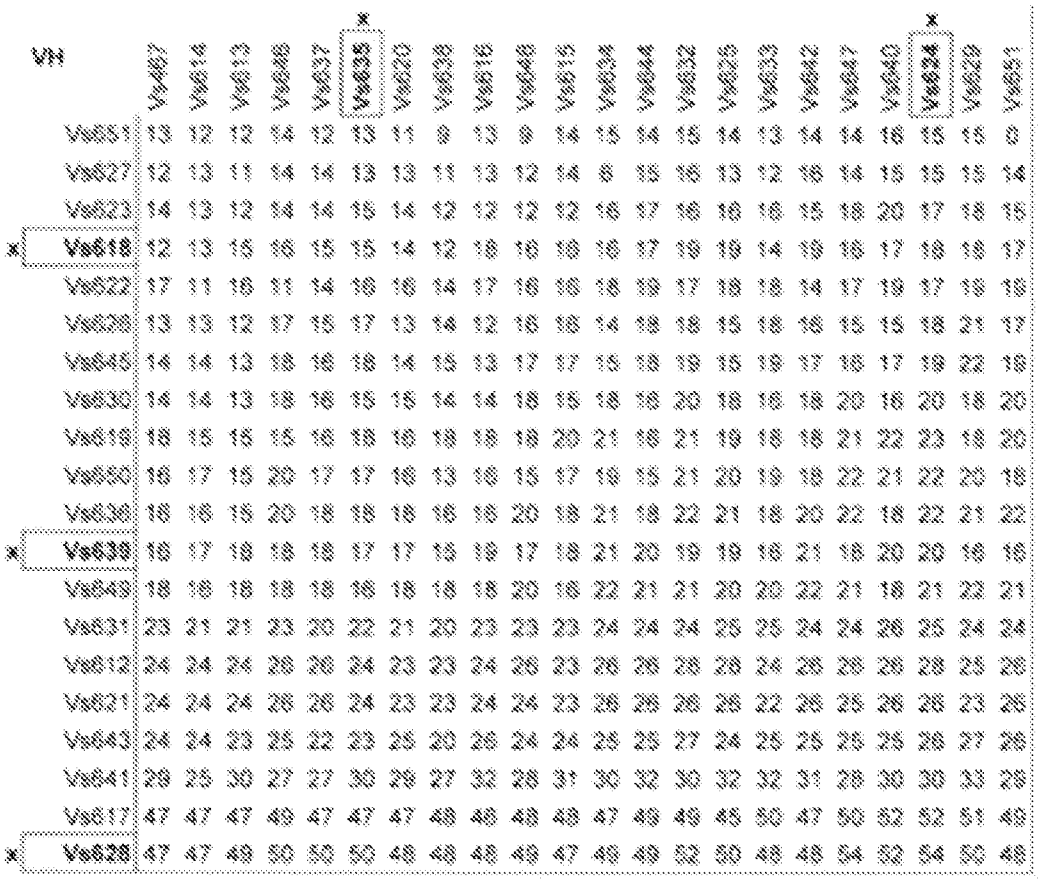

VH
Vs627 Vs614 Vs613 Vs648 Vs637 Vs635 Vs620 Vs638 Vs616 Vs646 Vs615 Vs634 Vs644 Vs632 Vs626 Vs633 Vs642 Vs647 Vs640 Vs624 Vs629 Vs651
Vs651 13 12 12 14 12 13 11 9 13 9 14 15 14 15 14 13 14 14 16 15 15 9
Vs627 12 13 11 14 14 13 13 11 13 12 14 8 15 16 13 12 16 14 15 15 15 14
Vs623 14 13 12 14 14 15 14 12 12 12 12 16 17 16 16 16 15 16 20 17 18 15
x Vs618 12 13 15 16 15 15 14 12 16 16 16 16 17 19 19 14 19 16 17 18 18 17
Vs622 17 11 16 11 14 16 16 14 17 16 16 18 19 17 18 18 14 17 19 17 19 19
Vs636 13 13 12 17 15 17 13 14 12 16 16 14 18 18 15 18 16 15 15 18 21 17
Vs645 14 14 13 18 16 16 14 15 13 17 17 15 18 19 15 19 17 16 17 19 22 18
Vs630 14 14 13 18 16 15 16 14 14 18 15 18 16 20 18 16 18 20 16 20 18 20
Vs619 18 15 15 15 16 18 16 19 19 19 20 21 16 21 19 18 18 21 22 23 19 20
Vs650 16 17 15 20 17 17 16 13 16 15 17 19 15 21 20 19 18 22 21 22 20 18
Vs628 16 16 15 20 18 18 18 16 16 20 18 21 18 22 21 18 20 22 18 22 21 22
x Vs639 16 17 18 18 18 17 17 15 19 17 18 21 20 19 19 16 21 18 20 20 16 16
Vs649 18 18 18 18 18 16 18 18 18 20 16 22 21 21 20 20 22 21 18 21 22 21
Vs631 23 21 21 23 20 22 21 20 23 23 23 24 24 24 25 25 24 24 26 25 24 24
Vs612 24 24 24 26 26 24 23 23 24 26 23 26 26 26 26 24 26 26 26 26 25 26
Vs621 24 24 24 26 26 24 23 23 24 24 23 26 26 26 26 22 26 25 26 26 23 25
Vs643 24 24 23 25 22 23 25 20 26 24 24 25 25 27 24 25 25 25 25 26 27 26
Vs641 29 25 30 27 27 30 29 27 32 28 31 30 32 30 32 32 31 29 30 30 33 29
Vs617 47 47 47 49 47 47 47 48 48 48 48 47 49 49 45 50 47 50 52 52 51 49
x Vs625 47 47 49 50 50 50 48 48 48 49 47 49 49 52 50 48 48 54 52 54 50 48

FIGURA 1d

| VH | Vs627 | Vs623 | x Vs618 | Vs622 | Vs626 | Vs645 | Vs630 | Vs619 | Vs650 | Vs636 | x Vs639 | Vs649 | Vs631 | Vs612 | Vs621 | Vs643 | Vs641 | Vs617 | x Vs628 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vs651 | 14 | 15 | 17 | 19 | 17 | 19 | 20 | 20 | 18 | 22 | 16 | 21 | 24 | 26 | 26 | 26 | 29 | 49 | 48 |
| Vs627 | 0 | 16 | 17 | 19 | 16 | 17 | 21 | 23 | 20 | 21 | 19 | 21 | 25 | 26 | 23 | 26 | 30 | 47 | 48 |
| Vs623 | 16 | 0 | 20 | 18 | 20 | 21 | 20 | 22 | 18 | 22 | 20 | 21 | 24 | 28 | 26 | 29 | 33 | 44 | 52 |
| x Vs618 | 17 | 20 | 0 | 22 | 19 | 22 | 21 | 23 | 22 | 22 | 21 | 21 | 26 | 28 | 28 | 28 | 30 | 49 | 47 |
| Vs622 | 19 | 18 | 22 | 0 | 22 | 23 | 22 | 21 | 24 | 24 | 25 | 22 | 26 | 27 | 27 | 19 | 20 | 50 | 54 |
| Vs626 | 16 | 20 | 19 | 22 | 0 | 9 | 20 | 22 | 20 | 22 | 21 | 24 | 25 | 26 | 26 | 28 | 29 | 52 | 52 |
| Vs645 | 17 | 21 | 22 | 23 | 9 | 0 | 22 | 26 | 23 | 24 | 24 | 25 | 29 | 32 | 32 | 31 | 33 | 50 | 52 |
| Vs630 | 21 | 20 | 21 | 22 | 20 | 22 | 0 | 23 | 21 | 2 | 22 | 23 | 27 | 27 | 27 | 29 | 33 | 53 | 52 |
| Vs619 | 23 | 22 | 23 | 21 | 22 | 26 | 23 | 0 | 18 | 25 | 24 | 26 | 27 | 32 | 32 | 31 | 27 | 56 | 56 |
| Vs650 | 20 | 18 | 22 | 24 | 20 | 23 | 21 | 18 | 0 | 22 | 22 | 26 | 25 | 28 | 28 | 28 | 32 | 53 | 52 |
| Vs636 | 21 | 22 | 22 | 24 | 22 | 24 | 2 | 25 | 22 | 0 | 24 | 24 | 29 | 28 | 28 | 32 | 35 | 55 | 52 |
| x Vs639 | 19 | 20 | 21 | 25 | 21 | 24 | 22 | 24 | 22 | 24 | 0 | 22 | 30 | 31 | 28 | 30 | 31 | 52 | 54 |
| Vs649 | 21 | 21 | 21 | 22 | 24 | 25 | 23 | 26 | 26 | 24 | 22 | 0 | 32 | 31 | 31 | 29 | 32 | 53 | 54 |
| Vs631 | 25 | 24 | 26 | 26 | 25 | 29 | 27 | 27 | 25 | 29 | 30 | 32 | 0 | 33 | 33 | 31 | 33 | 55 | 56 |
| Vs612 | 26 | 28 | 28 | 27 | 26 | 32 | 27 | 32 | 28 | 28 | 31 | 31 | 33 | 0 | 2 | 32 | 38 | 57 | 56 |
| Vs621 | 23 | 26 | 28 | 27 | 26 | 32 | 27 | 32 | 28 | 28 | 28 | 31 | 33 | 2 | 0 | 32 | 38 | 57 | 57 |
| Vs643 | 26 | 29 | 28 | 19 | 28 | 31 | 29 | 31 | 28 | 32 | 30 | 29 | 31 | 32 | 32 | 0 | 27 | 57 | 59 |
| Vs641 | 30 | 33 | 30 | 20 | 29 | 33 | 33 | 27 | 32 | 35 | 31 | 32 | 33 | 38 | 38 | 27 | 0 | 61 | 60 |
| Vs617 | 47 | 44 | 49 | 50 | 52 | 50 | 53 | 56 | 53 | 55 | 52 | 53 | 55 | 57 | 57 | 57 | 61 | 0 | 56 |
| x Vs628 | 48 | 52 | 47 | 54 | 52 | 52 | 52 | 55 | 52 | 52 | 54 | 54 | 56 | 56 | 57 | 59 | 60 | 56 | 0 |

**FIGURA 2**

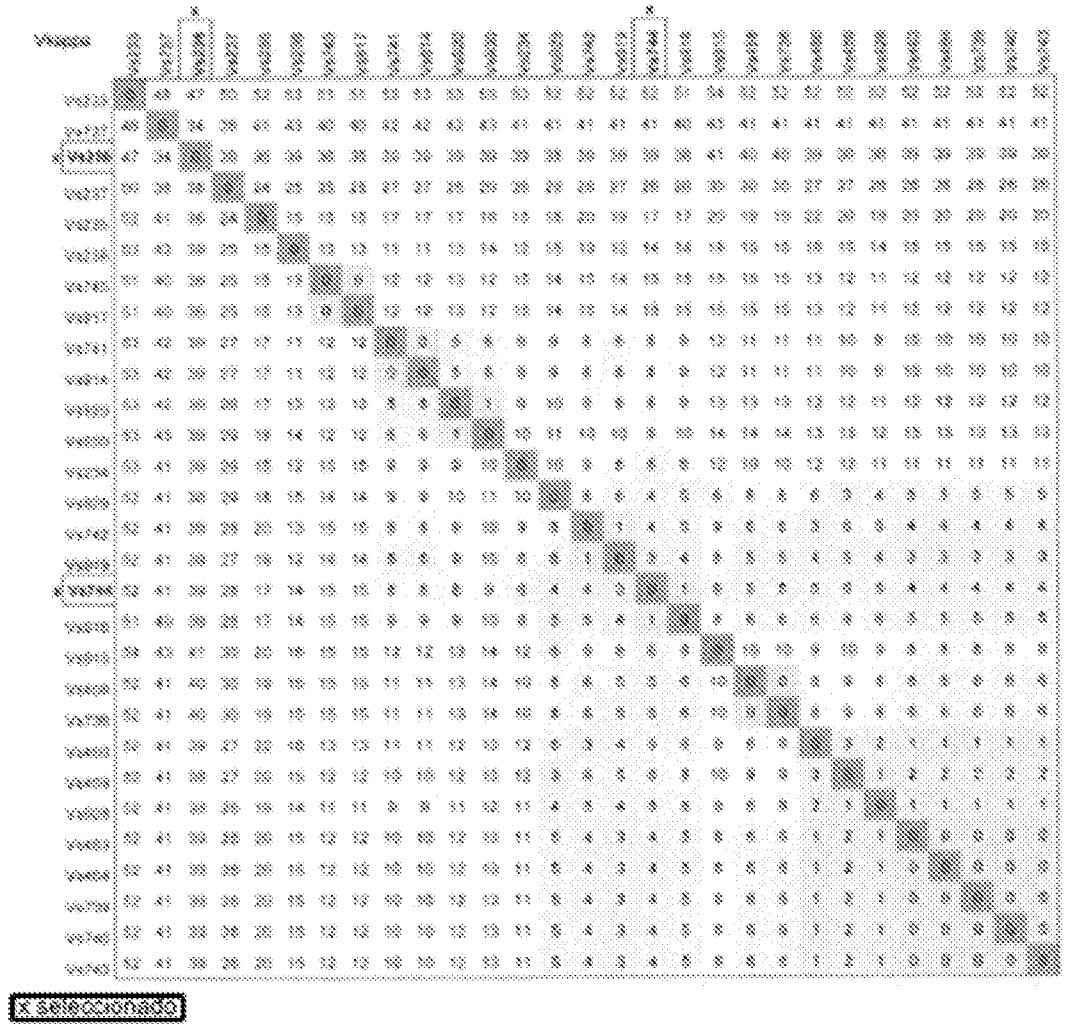


FIGURA 3

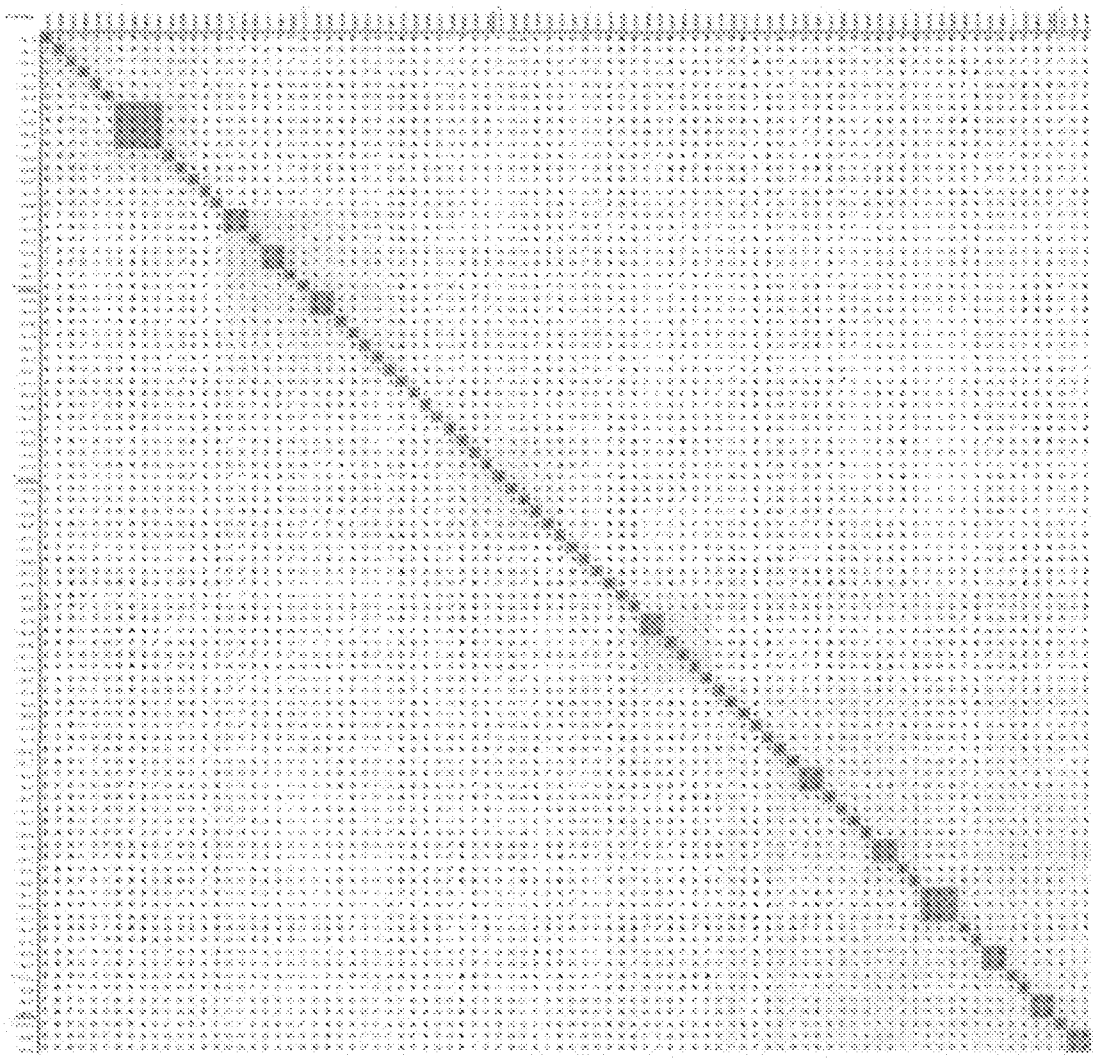


**FIGURA 4**

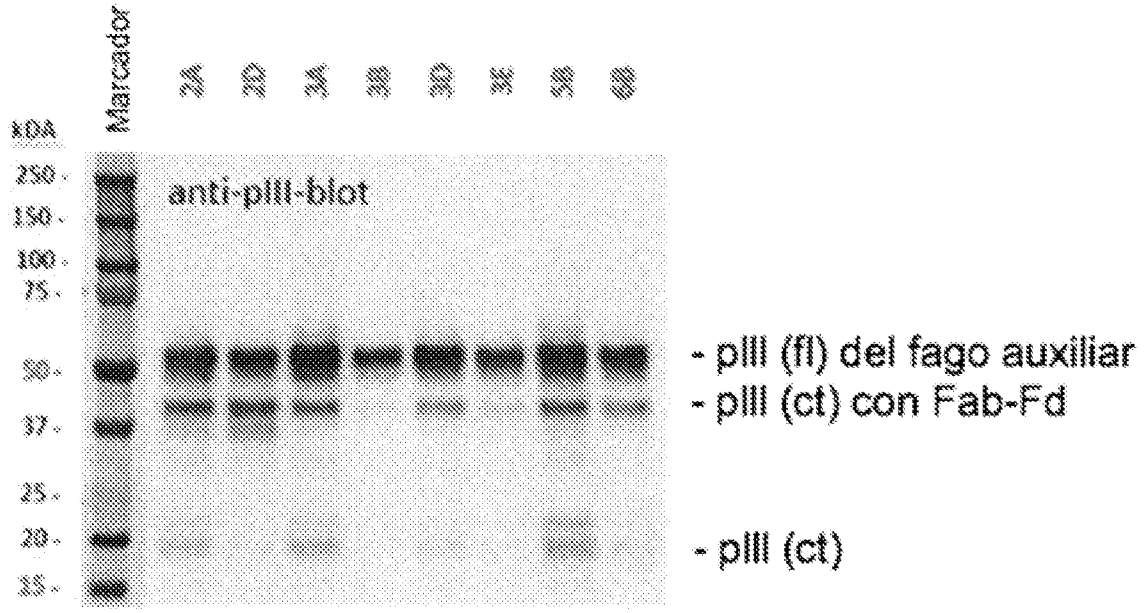

Marcador
2A
2D
3A
3B
3D
3E
5B
6B
kDA
250
150
100
75
50
37
25
20
15
anti-pIII-blot
- pIII (fl) del fago auxiliar
- pIII (ct) con Fab-Fd
- pIII (ct)

**FIGURA 5**

**Tasa de visualización 0,5 – 2 Fab/fago**
**(Determinación densiométrica)**

| Muestra | Banda | Volumen (Int) | Vol. ady. (Int) | Copias/fago |
|---|---|---|---|---|
| 2A | pIII | 11511917 | 11145893 | 3,1 |
| | pIII(ct)-Fd | 7013423 | 6647399 | 1,9 |
| 2D | pIII | 11373482 | 11007458 | 3,0 |
| | pIII(ct)-Fd | 7590092 | 7224068 | 2,0 |
| 3A | pIII | 14650733 | 14284709 | 3,6 |
| | pIII(ct)-Fd | 5669510 | 5303486 | 1,4 |
| 3B | pIII | 9805368 | 9439344 | 4,5 |
| | pIII(ct)-Fd | 1310933 | 944909 | 0,5 |
| 3D | pIII | 12649822 | 12283798 | 3,8 |
| | pIII(ct)-Fd | 4071063 | 3705039 | 1,2 |
| 3E | pIII | 9903114 | 9537090 | 4,3 |
| | pIII(ct)-Fd | 1870373 | 1504349 | 0,7 |
| 5B | pIII | 12813944 | 12447920 | 3,4 |
| | pIII(ct)-Fd | 6197015 | 5830991 | 1,6 |
| 6B | pIII | 11434733 | 11068709 | 3,7 |
| | pIII(ct)-Fd | 4422644 | 4056620 | 1,3 |

Figura 6

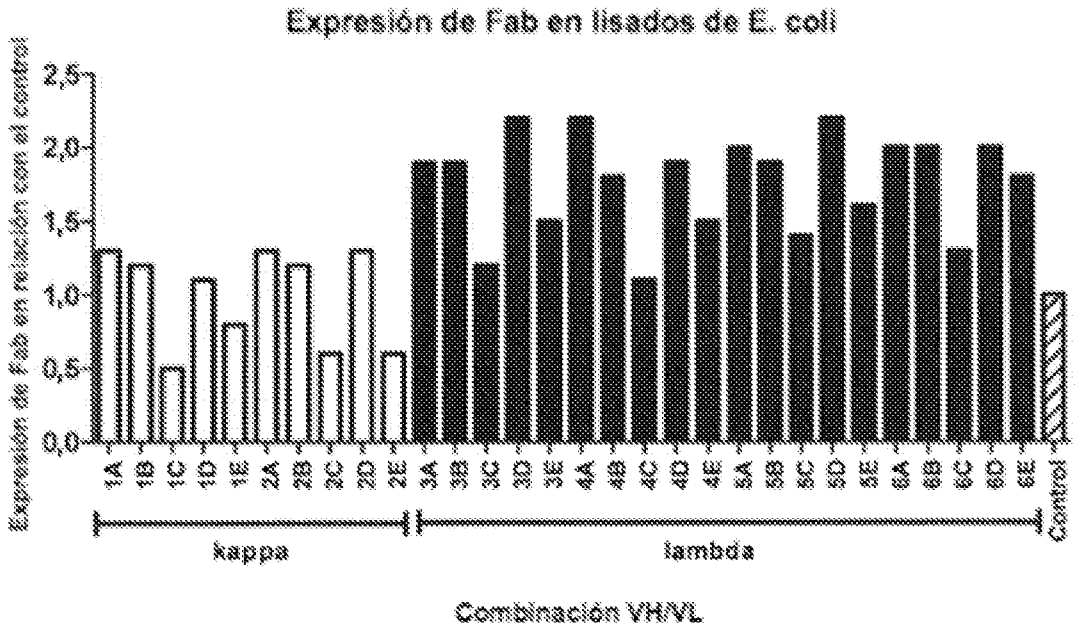

Expresión de Fab en lisados de E. coli
Expresión de Fab en relación con el control
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1A 1B 1C 1D 1E 2A 2B 2C 2D 2E 3A 3B 3C 3D 3E 4A 4B 4C 4D 4E 5A 5B 5C 5D 5E 6A 6B 6C 6D 6E Control
kappa
lambda
Combinación VH/VL

Figura 7

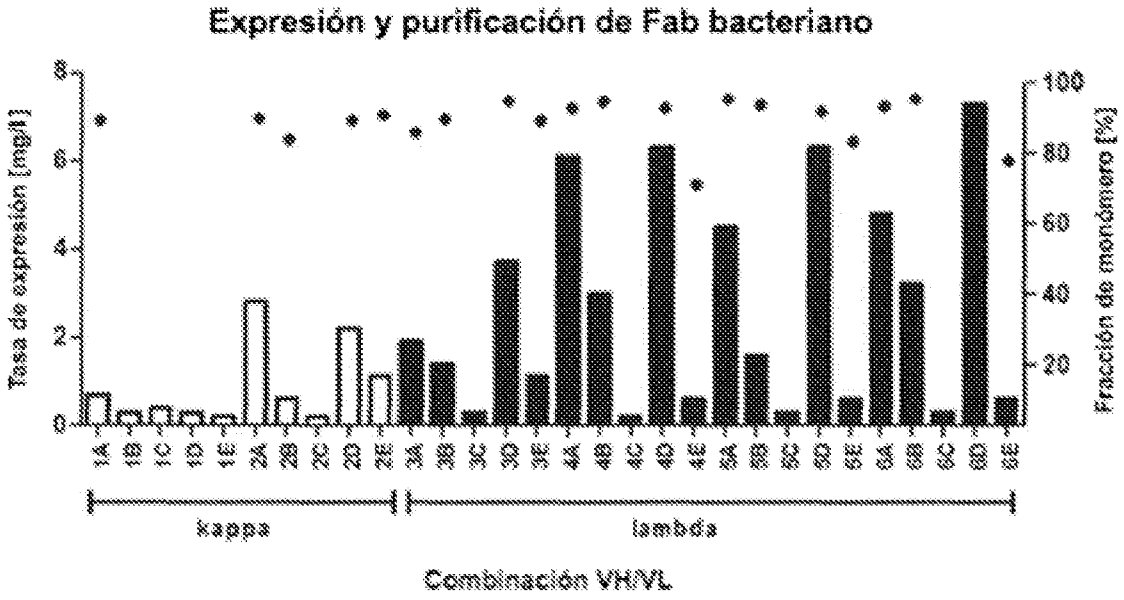

Expresión y purificación de Fab bacteriano
Tasa de expresión [mg/l]
Fracción de monómero [%]
0
2
4
6
8
20
40
60
80
100
1A 1B 1C 1D 1E 2A 2B 2C 2D 2E 3A 3B 3C 3D 3E 4A 4B 4C 4D 4E 5A 5B 5C 5D 5E 6A 6B 6C 6D 6E
kappa
lambda
Combinación VH/VL

Figura 8

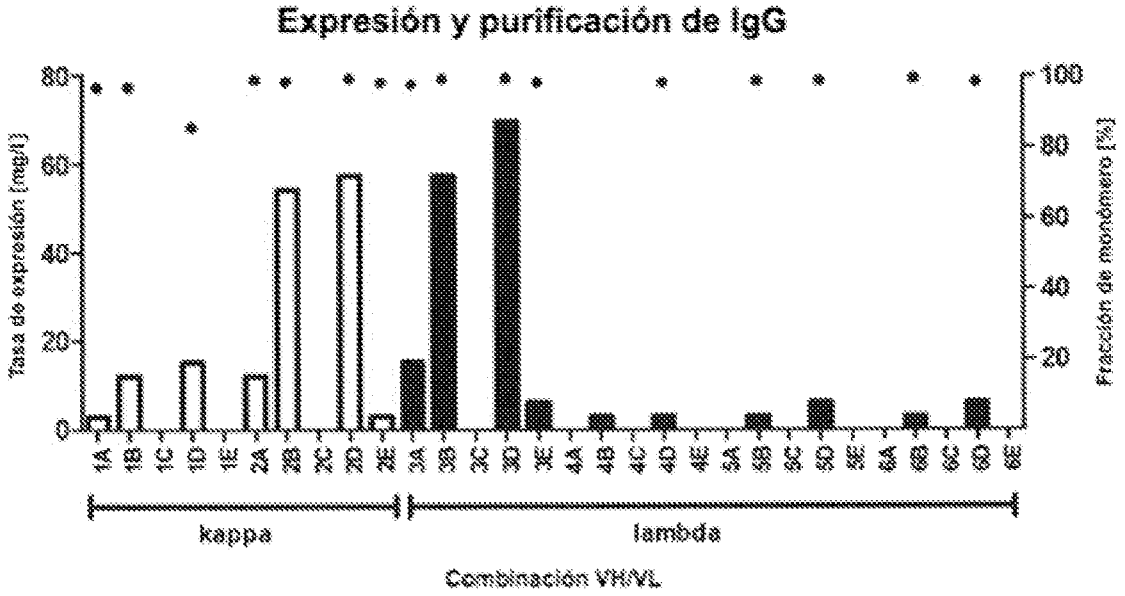

Expresión y purificación de IgG
Tasa de expresión [mg/l]
Fracción de monómero [%]
0
20
40
60
80
100
kappa
lambda
Combinación VH/VL

**FIGURA 9**

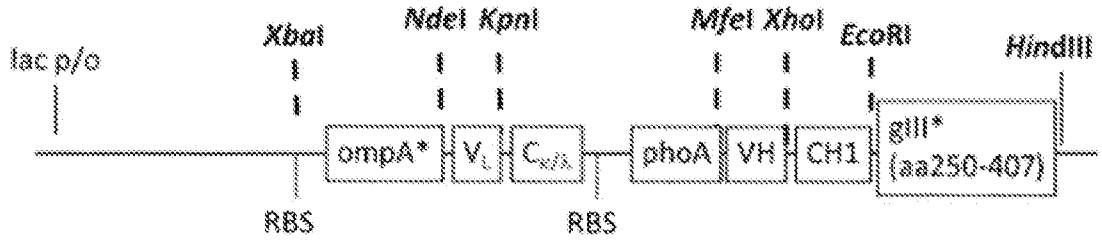

lac p/o
XbaI
NdeI KpnI
MfeI XhoI
EcoRI
HindIII
ompA*
VL
CK/λ
phoA
VH
CH1
gIII*
(aa250-407)
RBS
RBS

**FIGURA 10**

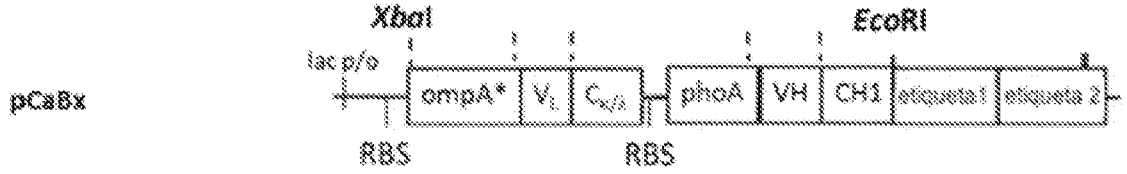

pCaBx
XbaI
EcoRI
lac p/o
ompA*
$V_L$
$C_{\kappa/\lambda}$
phoA
VH
CH1
etiqueta1
etiqueta 2
RBS
RBS

**FIGURA 11**

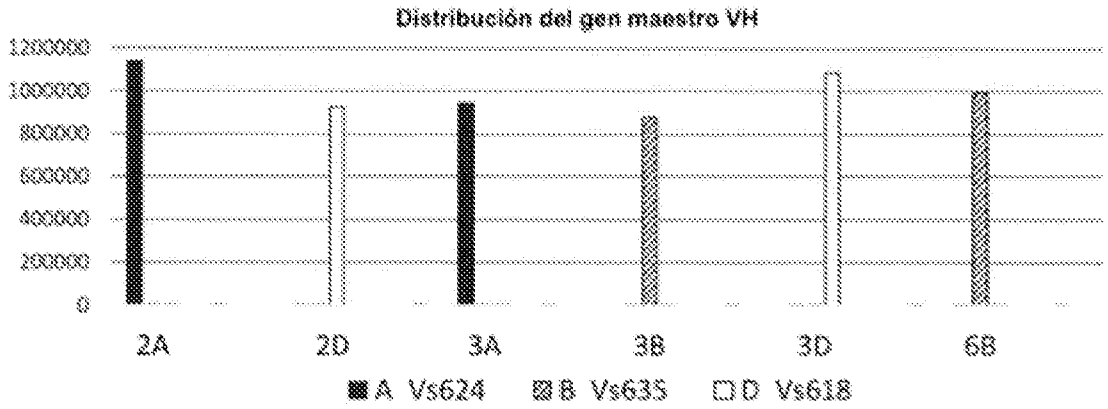

Distribución del gen maestro VH
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
2A
2D
3A
3B
3D
6B
A Vs624
B Vs635
D Vs618

**Figura 12**

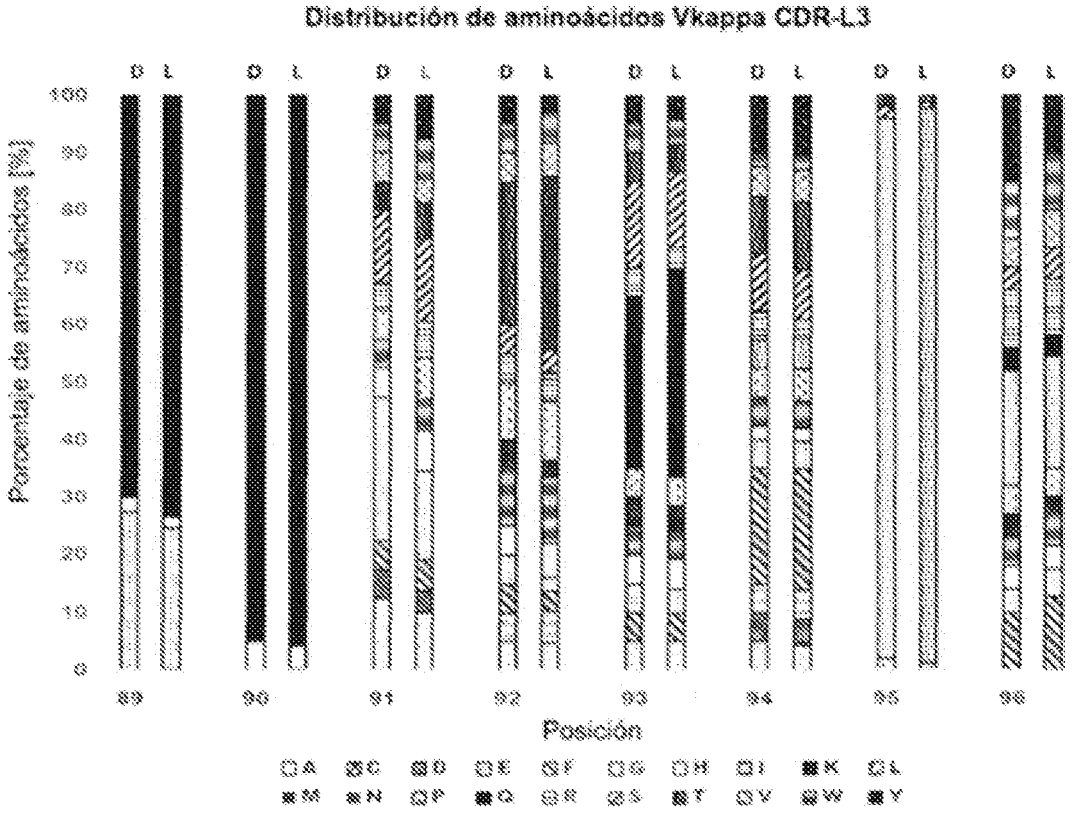

Distribución de aminoácidos Vkappa CDR-L3
Porcentaje de aminoácidos [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
D
L
89
90
91
92
93
94
95
96
Posición
A
C
D
E
F
G
H
I
K
L
M
N
P
Q
R
S
T
V
W
Y

FIGURA 13

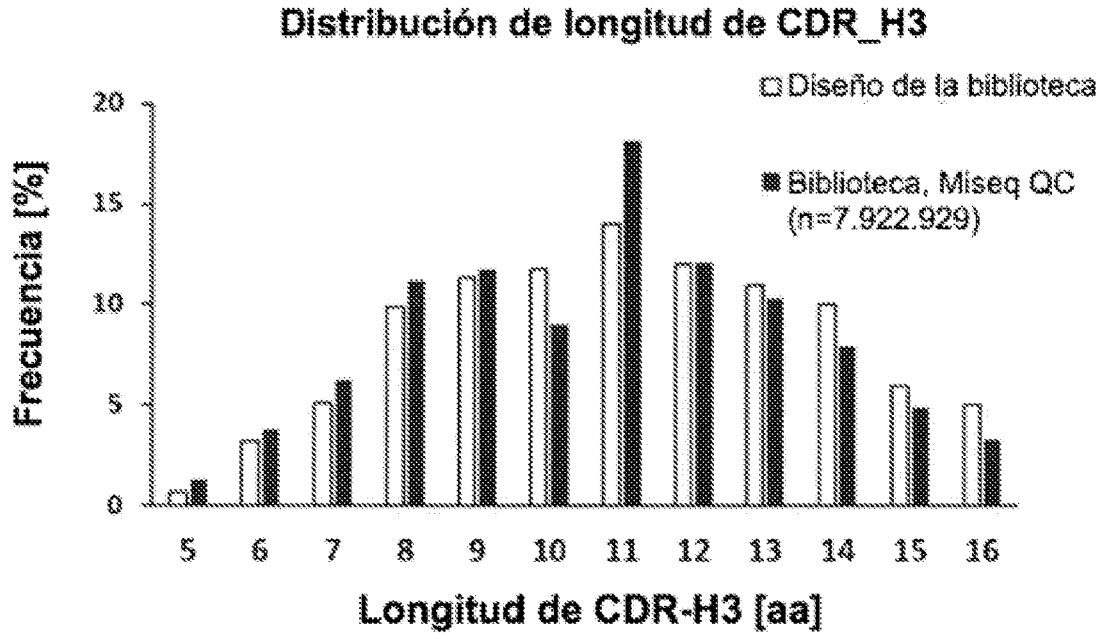

Distribución de longitud de CDR_H3
Diseño de la biblioteca
Biblioteca, Miseq QC
(n=7.922.929)
Frecuencia [%]
20
15
10
5
0
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
Longitud de CDR-H3 [aa]

**FIGURA 14**

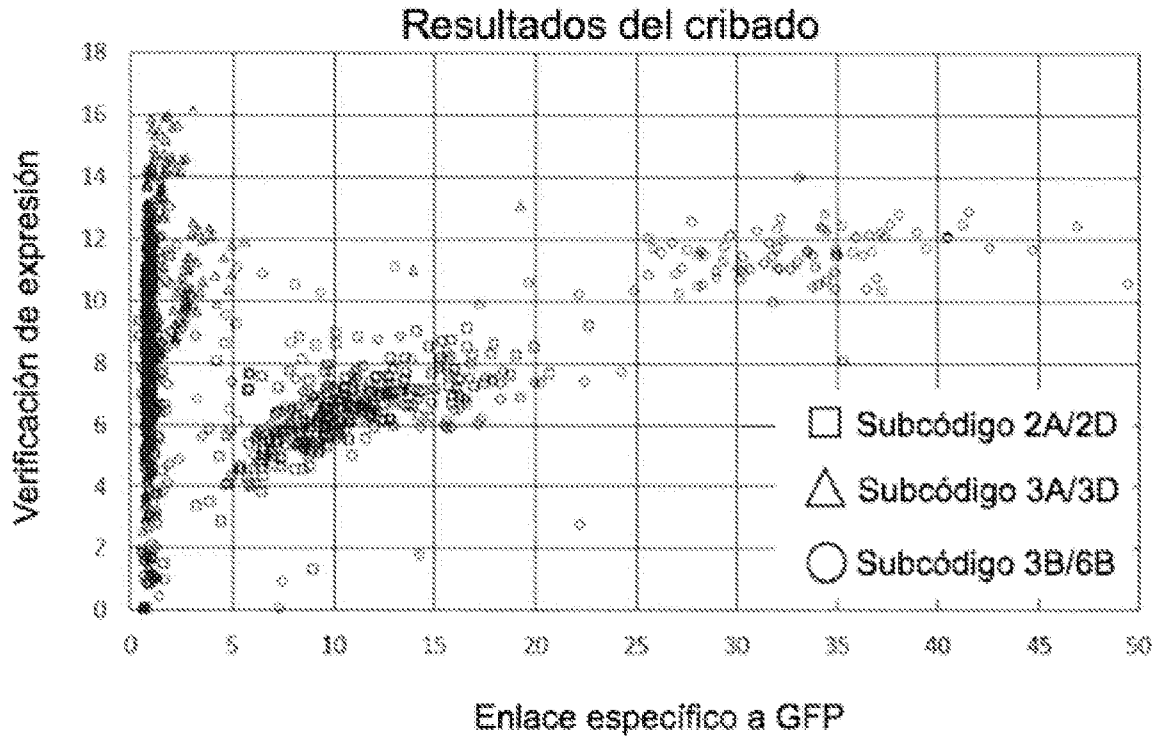

Resultados del cribado
Verificación de expresión
Enlace específico a GFP
Subcódigo 2A/2D
Subcódigo 3A/3D
Subcódigo 3B/6B
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

FIGURA 15

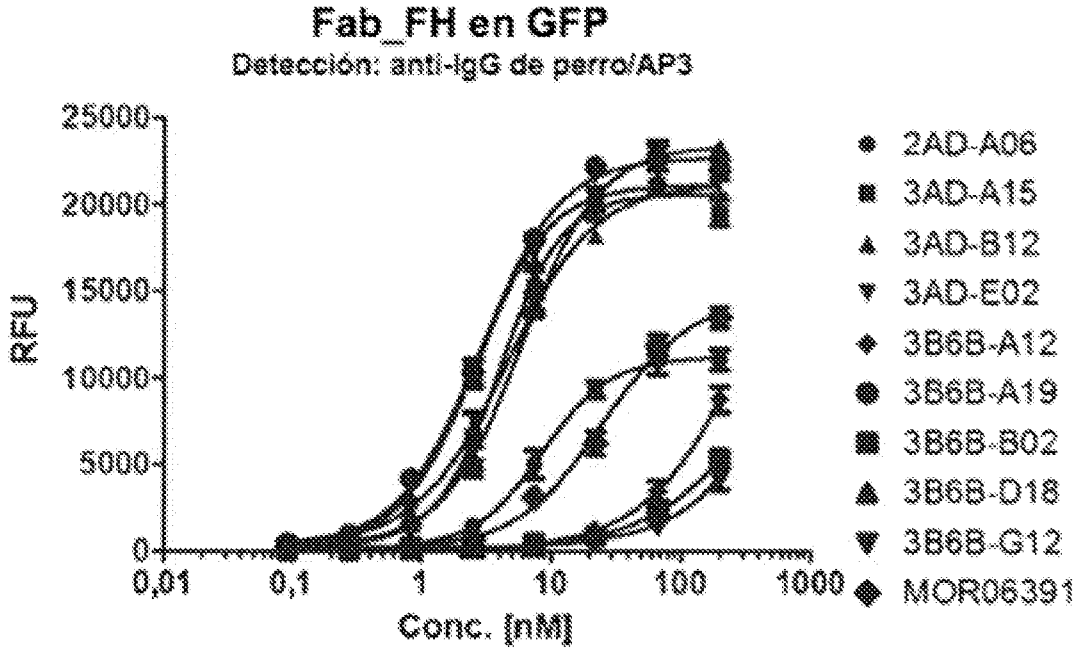
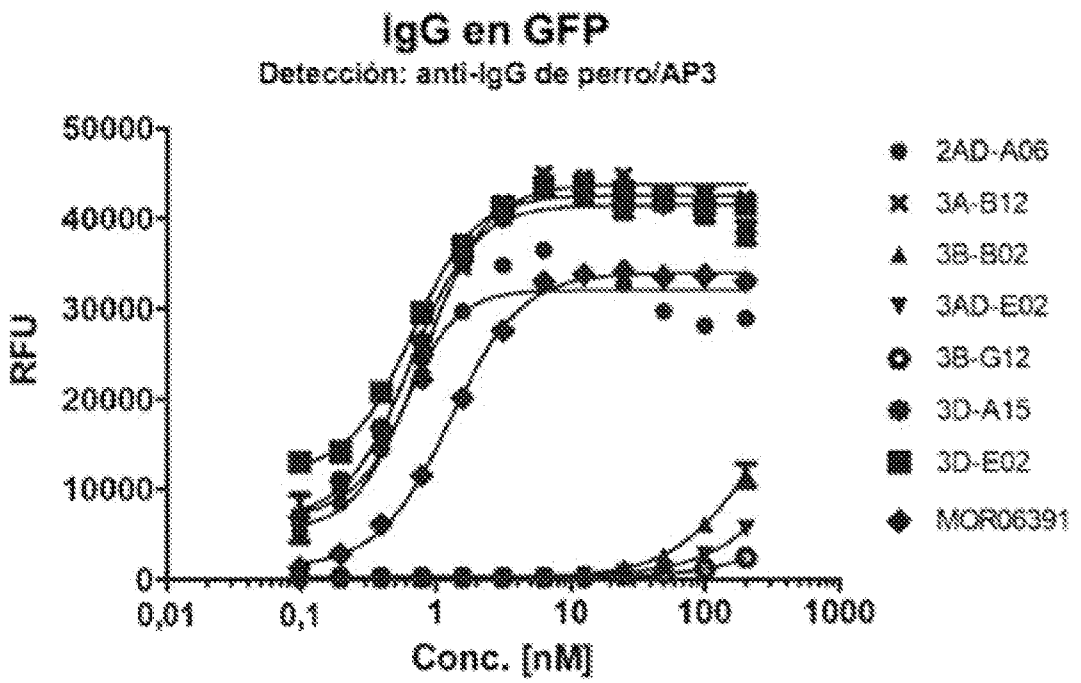

Fab_FH en GFP
Detección: anti-IgG de perro/AP3
RFU
25000
20000
15000
10000
5000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Conc. [nM]
2AD-A06
3AD-A15
3AD-B12
3AD-E02
3B6B-A12
3B6B-A19
3B6B-B02
3B6B-D18
3B6B-G12
MOR06391

FIGURA 16


IgG en GFP
Detección: anti-IgG de perro/AP3
RFU
50000
40000
30000
20000
10000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Conc. [nM]
2AD-A06
3A-B12
3B-B02
3AD-E02
3B-G12
3D-A15
3D-E02
MOR06391