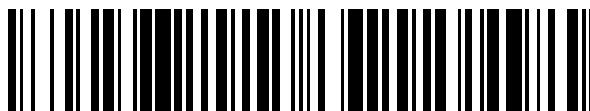


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 636**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2004 E 04816814 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1660186**

54 Título: **Humanización de anticuerpos**

30 Prioridad:

18.08.2003 US 496367 P

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

06.05.2014

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
ONE MEDIMMUNE WAY
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**DALL-ACQUA, WILLIAM;
DAMSCHRODER, MELISSA y
WU, HERREN**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 458 636 T3

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

DESCRIPCIÓN

Humanización de anticuerpos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de modificación por reingeniería o remodelación de anticuerpos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos, al tiempo que se mantiene la inmunoespecificidad de los anticuerpos para un antígeno. En particular, la presente invención proporciona métodos de producción de anticuerpos
10 inmunoespecíficos para un antígeno sintetizando una biblioteca combinatoria que comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo donador fusionado en marco con regiones de entramado de un sub-banco de regiones de entramado.

15 **1. Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos desempeñan un papel fundamental en nuestras respuestas inmunitarias. Pueden inactivar virus y toxinas bacterianas y son esenciales en el reclutamiento del sistema del complemento y diversos tipos de glóbulos blancos para destruir microorganismos invasores y parásitos grandes. Los anticuerpos se sintetizan exclusivamente por linfocitos B y se producen en millones de formas, cada una con una secuencia de aminoácidos diferente y un
20 sitio de unión diferente para un antígeno. Los anticuerpos, denominados colectivamente inmunoglobulinas (Ig), están entre los componentes de proteínas más abundantes en la sangre. Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 2^a ed., 1989, Garland Publishing, Inc.

Un anticuerpo típico es una molécula en forma de Y con dos cadenas pesadas (H) idénticas (que contienen cada una aproximadamente 440 aminoácidos) y dos cadenas ligeras (L) idénticas (que contienen cada una aproximadamente 220 aminoácidos). Las cuatro cadenas se mantienen juntas mediante una combinación de enlaces no covalentes y covalentes (disulfuro). Las enzimas proteolíticas, tales como papaína y pepsina, pueden dividir una molécula de anticuerpo en diferentes fragmentos característicos. La papaína produce dos fragmentos Fab idénticos y separados, cada uno con un sitio de unión a antígeno, y un fragmento Fc. La pepsina produce un
30 fragmento F(ab')₂. Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 2^a ed., 1989, Garland Publishing, Inc.

Tanto las cadenas L como H tienen una secuencia variable en sus extremos amino-terminales pero una secuencia constante en sus extremos carboxilo-terminales. Las cadenas L tienen una región constante de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud y una región variable del mismo tamaño. Las cadenas H también tienen una región variable de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, pero la región constante de las cadenas H tiene aproximadamente 330 ó 440 aminoácidos de longitud, dependiendo de la clase de la cadena H. Alberts *et al.*,
35 Molecular Biology of the Cell, 2^a ed., 1989, Garland Publishing, Inc. en la pág. 1019.

Sólo parte de la región variable participa directamente en la unión del antígeno. Estudios han mostrado que la variabilidad en las regiones variables tanto de las cadenas L como H está limitada en su mayor parte a tres regiones hipervariables pequeñas (también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR) en cada cadena. Las partes restantes de la región variable, conocidas como regiones de entramado (FR), son relativamente constantes. Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 2^a ed., 1989, Garland Publishing, Inc. en las págs. 1019 -
40 1020.

Se han usado inmunoglobulinas naturales en ensayos, diagnósticos y, en una medida más limitada, terapia. Sin embargo, tales usos, especialmente en terapia, se han visto dificultados por la naturaleza policlonal de inmunoglobulinas naturales. La llegada de anticuerpos monoclonales de especificidad definida aumentó las oportunidades para uso terapéutico. Sin embargo, la mayoría de los anticuerpos monoclonales se producen tras la
50 inmunización de un animal huésped roedor con la proteína diana y la posterior fusión de una célula del bazo de roedor que produce el anticuerpo de interés con una célula de mieloma de roedor. Por tanto, son esencialmente proteínas de roedor y como tales son naturalmente inmunogénicas en seres humanos, dando con frecuencia lugar a una respuesta inmunitaria no deseada denominada respuesta HAMA (anticuerpo humano anti-ratón).

Muchos grupos han ideado técnicas para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos. Tradicionalmente, se selecciona un molde humano mediante el grado de homología con el anticuerpo donador, es decir, se usa el anticuerpo humano más homólogo con el anticuerpo no humano en la región variable como molde para la humanización. El fundamento es que las secuencias de entramado sirven para mantener las CDR en su orientación espacial correcta para la interacción con un antígeno, y que a veces los residuos de entramado pueden incluso
60 participar en la unión a antígeno. Por tanto, si las secuencias de entramado humanas seleccionadas son las más similares a las secuencias de las regiones de entramado donadoras, se maximizará la probabilidad de que se conserve la afinidad en el anticuerpo humanizado. Winter (documento EP n.º 0239400), por ejemplo, propuso generar un anticuerpo humanizado mediante mutagénesis dirigida al sitio usando oligonucleótidos largos con el fin de injertar tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Aunque se ha mostrado que este enfoque funciona, limita la posibilidad de
65 seleccionar el mejor molde humano que soporta las CDR donadoras.

Aunque un anticuerpo humanizado es menos inmunogénico que su equivalente natural o quimérico en un ser humano, muchos grupos encuentran que un anticuerpo humanizado con CDR injertada puede demostrar una disminución significativa de la afinidad de unión (por ejemplo, Riechmann *et al.*, 1988, Nature 3 32:323-327). Por ejemplo, Reichmann y colaboradores encontraron que la transferencia de las regiones CDR sola no era suficiente para proporcionar una actividad de unión a antígeno satisfactoria en el producto con CDR injertada, y que también era necesario convertir un residuo de serina en la posición 27 de la secuencia humana en el correspondiente residuo de fenilalanina de rata. Estos resultados indicaron que pueden ser necesarios cambios en los residuos de la secuencia humana fuera de las regiones CDR para obtener una actividad de unión a antígeno eficaz. Aún así, la afinidad de unión todavía era significativamente inferior a la del anticuerpo monoclonal original.

Por ejemplo, Queen *et al* (patente estadounidense n.º 5.530.101) describieron la preparación de un anticuerpo humanizado que se une al receptor de interleucina-2, combinando las CDR de un anticuerpo monoclonal murino (mAb anti-Tac) con regiones de entramado y constantes de inmunoglobulina humana. Las regiones de entramado humanas se eligieron para maximizar la homología con la secuencia de mAb anti-Tac. Además, se usó modelado por ordenador para identificar residuos de aminoácido de entramado que era probable que interaccionaran con las CDR o antígeno, y se usaron aminoácidos de ratón en estas posiciones en el anticuerpo humanizado. Se notificó que el anticuerpo anti-Tac humanizado obtenido tenía una afinidad por el receptor de interleucina-2 (p55) de $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, lo que todavía era de tan sólo aproximadamente un tercio de la del mAb murino.

Otros grupos identificaron posiciones adicionales dentro de la secuencia de entramado de las regiones variables (es decir, fuera de las CDR y bucles estructurales de las regiones variables) en las que las identidades de aminoácido de los residuos pueden contribuir a obtener productos con CDR injertada con afinidad de unión satisfactoria. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.054.297 y 5.929.212. Además, es imposible saber de antemano lo eficaz que será una disposición de injerto de CDR particular para cualquier anticuerpo de interés dado.

Leung (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2003/0040606) describe un enfoque de parches de entramado, en el que la región variable de la inmunoglobulina se compartimentaliza en FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4, y se selecciona la secuencia de FR individual mediante la mejor homología entre el anticuerpo no humano y el molde de anticuerpo humano. Sin embargo, este enfoque requiere mucho trabajo y no pueden identificarse fácilmente las regiones de entramado óptimas.

Dado que están desarrollándose más anticuerpos terapéuticos y tienen resultados más prometedores, es importante poder reducir o eliminar la respuesta inmunitaria del organismo provocada por el anticuerpo administrado. Por tanto, nuevos enfoques que permiten un diseño por ingeniería eficaz y rápido de anticuerpos para que sean de tipo humano y/o que permiten una reducción del trabajo para humanizar un anticuerpo proporcionan grandes beneficios y valor médico.

La mención o discusión de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que la misma es técnica anterior con respecto a la presente invención.

2. Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método de generación de una biblioteca combinatoria que comprende una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena pesada humanizadas, produciéndose cada una de dichas secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables de cadena pesada humanizadas fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región determinante de complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena pesada humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena pesada de anticuerpo donador no humano y cada secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado de cadena pesada es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena pesada humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales. Según esta realización, el método puede comprender además introducir la biblioteca combinatoria de secuencias de ácido nucleico en una población de células.

En otra realización, la presente invención proporciona un método de generación de una biblioteca combinatoria que comprende una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena ligera humanizadas, produciéndose cada una de dichas secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables de cadena ligera humanizadas fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena ligera

humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena ligera y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena ligera humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena ligera de anticuerpo donador no humano y cada secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado de cadena ligera es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena ligera humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales. Según esta realización, el método puede comprender además introducir la biblioteca combinatoria de secuencias de ácido nucleico en una población de células. En otra realización, la presente invención proporciona un método de generación de una biblioteca combinatoria que comprende secuencia de ácido nucleico que comprende: (i) un primer conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena pesada humanizadas, produciéndose cada una de dicho primer conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena pesada humanizadas fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena pesada humana, y (ii) un segundo conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena ligera humanizadas, produciéndose cada una de dicho segundo conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena ligera humanizadas fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena ligera y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena ligera humana, en el que las CDR de región variable de cadena pesada se derivan de una región variable de cadena pesada de anticuerpo donador no humano, las CDR de región variable de cadena ligera se derivan de una región variable de cadena ligera de anticuerpo donador no humano, cada secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado de cadena pesada humana es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena pesada humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales y cada secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado de cadena ligera humana es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena ligera humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales. Según esta realización, el método puede comprender además introducir la biblioteca combinatoria de secuencias de ácido nucleico en una población de células.

Los métodos descritos en el presente documento pueden proporcionar células que comprenden, que contienen o diseñadas por ingeniería para expresar las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento.

La presente invención proporciona un método de producción de un anticuerpo humanizado que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, comprendiendo dicho método: (a) sintetizar una pluralidad de secuencias de polinucleótido que comprenden cada una una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena pesada humanizada, produciéndose dicha secuencia de nucleótidos fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena pesada humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena pesada de anticuerpo donador no humano que se une inmunoespecíficamente a dicho antígeno y cada secuencia de ácido nucleico de región de entramado de cadena pesada es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena pesada humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales; (b) introducir las secuencias de polinucleótido en una población de células que contienen cada una una secuencia de polinucleótido que codifica para una región variable de cadena ligera; y (c) expresar las secuencias de polinucleótido que codifican para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. Pueden generarse sub-bancos de secuencias de región de entramado de cadena pesada antes de la etapa (a) del método anteriormente descrito. La región variable de cadena ligera puede ser una región variable de cadena ligera humanizada o humana. Según esta realización, el método puede comprender además una etapa (d) que comprende examinar para seleccionar un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al antígeno.

La presente invención proporciona un método de producción de un anticuerpo humanizado que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, comprendiendo dicho método: (a) sintetizar una pluralidad de secuencias de polinucleótido que comprenden cada una una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena ligera humanizada, produciéndose dicha secuencia de nucleótidos fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena ligera y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena ligera humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena ligera de anticuerpo donador no humano que se une inmunoespecíficamente a dicho antígeno y cada secuencia de ácido nucleico de región de entramado de cadena ligera es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena ligera humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales; (b) introducir las secuencias de polinucleótido en una población de células que contienen cada una un polinucleótido que codifica para una región variable de cadena pesada; y (c) expresar las secuencias de polinucleótido que codifican para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. Pueden generarse sub-bancos de secuencias de región de entramado de cadena ligera antes de la etapa (a) del método anteriormente descrito. La región variable de cadena pesada puede ser una región variable de cadena pesada humanizada o humana. Según esta realización, el método puede comprender además una etapa (d) que comprende examinar para seleccionar un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al antígeno.

En otra realización, la presente invención proporciona un método de producción de un anticuerpo humanizado que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, comprendiendo dicho método: (a) sintetizar una pluralidad de primeras secuencias de polinucleótido que comprenden cada una una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena pesada humanizada, produciéndose dicha secuencia de nucleótidos fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena pesada humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena pesada de anticuerpo donador no humano que se une inmunoespecíficamente a dicho antígeno y cada secuencia de ácido nucleico de región de entramado de cadena pesada es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena pesada humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales; (b) sintetizar una pluralidad de segundas secuencias de polinucleótido que comprenden cada una una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena ligera humanizada, produciéndose dicha secuencia de nucleótidos fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena ligera y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena ligera humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena ligera de anticuerpo donador no humano que se une inmunoespecíficamente a dicho antígeno y cada secuencia de ácido nucleico de región de entramado de cadena ligera es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena ligera humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales; (c) introducir las secuencias de ácido nucleico generadas en las etapas (a) y (b) en una población de células; y (d) expresar las secuencias de nucleótidos que codifican para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. Según esta realización, el método puede comprender además una etapa (e) que comprende examinar para seleccionar un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al antígeno. Pueden generarse sub-bancos de secuencias de región de entramado de cadena ligera antes de la etapa (a) del método anteriormente descrito.

En métodos de la invención, el/los sub-banco(s) de regiones de entramado humanas comprende(n) regiones de entramado de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales en las que se han introducido una o más mutaciones. Los sub-bancos de regiones de entramado pueden usarse fácilmente para sintetizar una biblioteca combinatoria de anticuerpos que puede examinarse para determinar su inmunoespecificidad para un antígeno de interés, así como su inmunogenicidad en un organismo de interés.

La invención se basa, en parte, en la síntesis de sub-bancos de regiones de entramado para las regiones de entramado de cadena pesada variable y la regiones de entramado de cadena ligera variable de anticuerpos y en la síntesis de bibliotecas combinatorias de anticuerpos que comprenden una región de cadena pesada variable y/o una

región de cadena ligera variable produciéndose la(s) región/regiones de cadenas variables fusionando entre sí en marco regiones determinantes de complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo donador y regiones de entramado derivadas de sub-bancos de regiones de entramado. La síntesis de sub-bancos de regiones de entramado permite la producción rápida, que requiere menos trabajo, de bibliotecas combinatorias de anticuerpos (con o sin regiones constantes) que pueden examinarse fácilmente para determinar su inmunoespecificidad para un antígeno de interés, así como su inmunogenicidad en un organismo de interés. El enfoque de biblioteca descrito en el presente documento permite una identificación y selección eficiente de regiones de entramado aceptoras humanas. Además de la síntesis de sub-bancos de regiones de entramado, pueden generarse sub-bancos de CDR y fusionarse al azar en marco con regiones de entramado de sub-bancos de regiones de entramado para producir bibliotecas combinatorias de anticuerpos (con o sin regiones constantes) que pueden examinarse para determinar su inmunoespecificidad para un antígeno de interés, así como su inmunogenicidad en un organismo de interés. La metodología de biblioteca combinatoria de la invención se muestra a modo de ejemplo en el presente documento para la producción de anticuerpos humanizados para su uso en seres humanos. Sin embargo, la metodología de biblioteca combinatoria puede aplicarse fácilmente a la producción de anticuerpos para su uso en cualquier organismo de interés.

En algunas realizaciones, una o más de las CDR derivadas de la(s) región/regiones variable(s) de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo donador contiene(n) una o más mutaciones con respecto a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la CDR correspondiente en el anticuerpo donador.

Pueden producirse anticuerpos humanizados mediante los métodos descritos en el presente documento; tales anticuerpos pueden formularse en una composición que comprende un anticuerpo humanizado producido mediante los métodos descritos en el presente documento y un portador, diluyente o excipiente, que puede ser una composición farmacéutica en una forma para su uso previsto.

Los anticuerpos humanizados generados tal como se describe en el presente documento comprenden una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada. Los anticuerpos generados tal como se describe en el presente documento pueden comprender además una(s) región/regiones constante(s).

Los anticuerpos humanizados generados según la invención pueden conjugarse o fusionarse con un resto (por ejemplo, un fármaco o agente terapéutico). Tales anticuerpos pueden formularse en composiciones, preferiblemente composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo generado y/o identificado según la presente invención y un portador, diluyente o excipiente. Las composiciones, preferiblemente composiciones farmacéuticas, pueden comprender un anticuerpo humanizado (o fragmento del mismo) conjugado o fusionado con un resto (por ejemplo, un fármaco o agente terapéutico), y un portador, diluyente o excipiente. Un anticuerpo humanizado generado y/o identificado según la presente invención puede usarse solo o en combinación con otras terapias, para prevenir, tratar, gestionar o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo.

Las composiciones farmacéuticas pueden usarse para la prevención, la gestión, el tratamiento o la mejora de una enfermedad o uno o más síntomas de la misma. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son estériles y están en forma adecuada para un método de administración particular para un sujeto con una enfermedad.

Los métodos de detección, diagnóstico y/o monitorización de la progresión de un trastorno pueden usar uno o más anticuerpos humanizados generados y/o identificados según los métodos de la invención.

2.1 Terminología

Tal como se usan en el presente documento, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o a la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica para al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de entramado. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere al anticuerpo o a la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica para la(s) región/regiones constante(s). En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a un anticuerpo humano o a una secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica para al menos el 80%, preferiblemente, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de entramado. Una región de entramado aceptora y/o región/regiones constante(s) aceptora(s) puede(n), por ejemplo, derivarse u obtenerse de un gen de anticuerpo de línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo o anticuerpos disponibles comercialmente).

Tal como se usan en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camélidos, anticuerpos quiméricos, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un único dominio, fragmentos Fab, fragmentos F(ab), Fv con enlaces disulfuro (sdFv), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por

ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

Un anticuerpo típico contiene dos cadenas pesadas emparejadas con dos cadenas ligeras. Una cadena pesada de longitud completa tiene aproximadamente 50 kD de tamaño (aproximadamente 446 aminoácidos de longitud) y se codifica por un gen de región variable de cadena pesada (aproximadamente 116 aminoácidos) y un gen de región constante. Hay diferentes genes de región constante que codifican para la región constante de cadena pesada de diferentes isotipos tales como secuencias alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu. Una cadena ligera de longitud completa tiene aproximadamente 25 kD de tamaño (aproximadamente 214 aminoácidos de longitud) y se codifica por un gen de región variable de cadena ligera (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda. Las regiones variables de la cadena ligera y/o pesada son responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras típicas de un anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “CDR” se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpo. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan como CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. Los límites exactos de estas CDR se han definido de diferentes maneras según diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987) y (1991)) no sólo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chothia *et al.*, Nature 342:877-883 (1989)) encontraron que determinadas sub-porciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de estructura principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se designaron como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 en las que “L” y “H” designan las regiones de cadena ligera y de cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se solapan con las CDR de Kabat. Se han descrito otras CDR que definen límites que se solapan con las CDR de Kabat por Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Todavía otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente ninguno de los sistemas anteriores, pero no obstante se solaparán con las CDR de Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la vista de la predicción o de hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso las CDR completas no tengan un impacto significativo sobre la unión a antígeno. Los métodos usados en el presente documento pueden usar CDR definidas según cualquiera de estos sistemas, aunque realizaciones preferidas usan CDR definidas por Kabat o Chothia.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado” en el contexto de agente proteico (por ejemplo, proteínas, polipéptidos y péptidos, tales como anticuerpos) se refiere a un agente proteico que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones y/o adiciones de residuos de aminoácido. El término “derivado” tal como se usa en el presente documento también se refiere a un agente proteico que se ha modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al agente proteico. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Puede producirse un derivado de un agente proteico mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un agente proteico puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. Un derivado de un agente proteico presenta una función similar o idéntica a la del agente proteico del que se deriva.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan de manera intercambiable para un estado en un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo donador” se refiere a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo donador es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se derivan las regiones de entramado. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término “anticuerpo donador” se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o la duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, prevenir la recidiva, el desarrollo, la aparición o la progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno o potenciar o mejorar el/los efecto(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico).

Tal como se usa en el presente documento, el término “epítomos” se refiere a fragmentos de un polipéptido o una proteína que tienen actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero y lo más preferiblemente en un ser humano. Un epítomo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o una proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítomo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o una proteína al que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo tal como se

determina mediante cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos. No se necesita que los epítomos antigénicos sean necesariamente inmunogénicos.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína de fusión” se refiere a un polipéptido o una proteína (incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos de una primera proteína o polipéptido o fragmento funcional, análogo o derivado del mismo, y una secuencia de aminoácidos de una proteína, polipéptido o péptido heterólogo (es decir, una segunda proteína o polipéptido o fragmento, análogo o derivado del mismo diferente de la primera proteína o fragmento, análogo o derivado del mismo). En una realización, una proteína de fusión comprende un agente profiláctico o terapéutico fusionado a una proteína, polipéptido o péptido heterólogo. Según esta realización, la proteína, polipéptido o péptido heterólogo puede ser un tipo diferente o no de agente profiláctico o terapéutico. Por ejemplo, pueden fusionarse entre sí dos proteínas, polipéptidos o péptidos diferentes con actividad inmunomoduladora para formar una proteína de fusión. En una realización preferida, las proteínas de fusión conservan o tienen una actividad mejorada con respecto a la actividad de la proteína, polipéptido o péptido original antes de fusionarse a una proteína, polipéptido o péptido heterólogo.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” se refiere a un péptido o polipéptido (incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 residuos de aminoácido contiguos, al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, al menos 200 residuos de aminoácido contiguos o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido o proteína. En una realización específica, un fragmento de una proteína o polipéptido conserva al menos una función de la proteína o polipéptido.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento funcional” se refiere a un péptido o polipéptido (incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 residuos de aminoácido contiguos, al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de un segundo polipéptido o proteína diferente, en el que dicho polipéptido o proteína conserva al menos una función del segundo polipéptido o proteína diferente. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido o una proteína conserva al menos dos, tres, cuatro o cinco funciones de la proteína o polipéptido. Preferiblemente, un fragmento de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno particular conserva la capacidad de unirse inmunoespecíficamente al antígeno.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “región de entramado” o “secuencia de entramado” se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Dado que la definición exacta de una secuencia de CDR puede determinarse mediante diferentes sistemas, el significado de una secuencia de entramado está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR1, 2, y 3 de cadena ligera y CDR1, 2, y 3 de cadena pesada) también dividen las regiones de entramado en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 está situada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de entramado, según se denomina en otros casos, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina que se produce de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FR representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de entramado. Como ejemplo, las tablas 1-4 indican las secuencias de línea germinal de FR1, 2, 3 y 4 de la cadena ligera kappa, respectivamente. Las tablas 5-7 indican las secuencias de línea germinal de FR1, 2 y 3 de cadena pesada según la definición de Kabat, respectivamente. Las tablas 8-10 indican las secuencias de línea germinal de FR 1, 2 y 3 de cadena pesada según la definición de Chothia, respectivamente. La tabla 11 indica la secuencia de línea germinal de FR4 de la cadena pesada.

60 Tablas 1-65

El número de SEQ ID para cada secuencia descrita en las tablas 1-65 se indica en la primera columna de cada tabla.

65 Tabla 1. FR1 de cadenas ligeras

1 GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 2 GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 3 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCGTACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 4 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 5 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCGTACCCCTCGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 6 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 7 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 8 GAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTTGTCTATCACCCCTGGAGAGCAGGCCTCCATCTCCTGC
 9 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCCTGTACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTTC
 10 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
 11 GATGTTGTGATGACACAGTCTCCAGCTTTCCTCTCTGTGACTCCAGGGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
 12 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 13 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
 14 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 15 GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTATGTCAGCGACTCCAGGAGACAAAGTCAACATCTCCTGC
 16 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 17 GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 18 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 19 AACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTGCCATGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 20 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 21 GAAATAGTGATGATGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 22 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 23 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 24 GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 25 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 26 GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCTTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAGTATCATTTTGC
 27 GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 28 GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGT
 29 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 30 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 31 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 32 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 33 GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCATTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 34 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 35 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 36 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 37 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 38 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 39 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 40 GAAATTGTAATGACACAGTCTCCACCCACCCTGTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCACCCCTCTCCTGC
 41 GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 42 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC

ES 2 458 636 T3

43 GAAATTGGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 44 GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGC
 45 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 46 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCOOCCTCCATCTCCTGC

Tabla 2. FR2 de cadenas ligeras

47	TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTAT
48	TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTAT
49	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
50	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
51	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTAT
52	TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTAT
53	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
54	TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCACACTCCTGATCTAT
55	TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTAT
56	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAG
57	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAAGCCCCAAAGCTCCTCATCAAG
58	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTAT
59	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAG
60	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTAT
61	TGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAGCTGCTATTTTCATTATTCAA
62	TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
63	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
64	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
65	TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCACCTGATCTAT
66	TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
67	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
68	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGTCCCTGATCTAT
69	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
70	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
71	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
72	TGGTATCTGCAGAAACCAGGGAAATCCCCTAAGTCTTCCTCTAT
73	TGGTATCAGCAAAAACCAGCAAAAGCCCCTAAGTCTTCATCTAT
74	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGTCCCTGATCTAT
75	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGTCCCTGATCTAT
76	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
77	TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
78	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
79	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
80	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
81	TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTCCCTGATCTAT
82	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAC
83	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT

84	TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTAT
85	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTAC
86	TGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCGCCAGGCTCCTCATCTAT
87	TGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
88	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCTGGCGCCAGGCTCCTCATCTAT
89	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
90	TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTAC
91	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
92	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT

Tabla 3. FR3 de cadenas ligeras

93

**GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC**

94

**GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC**

95

**GGAGTGCCAGATAGGTTCACTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGA**

96

**GGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC**

97

**GGAGTGCCAGATAGGTTCACTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC**

98

**GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAAGC
TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC**

99

**GGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC**

100

**GGAGTGCCAGATAGGTTCACTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGTGGAGGC
TGAGGATTTGGAGTTTATTACTGC**

101

**GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAAGC
TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC**

102

**GGGGTCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCCTCACCATCAATAGCCTGGAAGCT
GAAGATGCTGCAACGTATTACTGT**

103

GGGGTCCCCTCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCTTTACCATCAGTAGCCTGGAAGCT
GAAGATGCTGCAACATAATTACTGT

104

GGGGTCCCATCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATGTTGCAACTTATTACTGT

105

GGGGTCCCCTCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCTTCACCATCAATAGCCTGGAAGCT
GAAGATGCTGCAACGTATTACTGT

106

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

107

GGAATCCCACCTCGATTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCT
GAGGATGCTGCATATTACTTCTGT

108

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGC

109

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

110

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GATGATTTTGCAACTTATTACTGC

111

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

112

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGC

113

GGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAAGTTTATTACTGT

114

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

115

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTACTATTGT

116

GGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

117

GGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

118

GGGGTCTCATCGAGGTTCAAGTGGCAGGGGATCTGGGACGGATTCACTCTCACCATCATCAGCCTGAAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

119

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

120

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGTTGCCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

121

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

122

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTACTATTGT

123

GGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

124

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

125

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCTGCCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

126

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAGTTTACTACTGT

127

GGAGTCCCATCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATGTTGCAACTTATTACGGT

128

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGT

129

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGT

130

GGAGTCCCATCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATGTTGCAACTTATTACGGT

131

GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGT

132

AGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAAGTTTATTACTGT

133

GGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAAGTTTATTACTGT

134

GGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT
GAAGATTTTGCAAGTGTATTACTGT

135

GGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT
GAAGATTTTGCAAGTGTATTACTGT

136

GGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCT
GAAGATGTGGCAGTTTATTACTGT

137

GGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCAAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC

138

GGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCAAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC

Tabla 4. FR4 de cadenas ligeras

139	TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
140	TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
141	TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
142	TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
143	TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA

Tabla 5. FR1 de cadenas pesadas (definición de Kabat)

144

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCTGGTTACACCTTACC

145

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGC
TTCTGGATACACCTCACC

146

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTT
TCCGGATACACCCTCACT

147

CAGGTTACAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCT
TCTGGATACACCTCACT

148

CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCT
TCCGGATACACCTCACC

149

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGC
ATCTGGATACACCTCACC

150

CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCTGGATTACCTTTACT

151

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCTGGAGGCACCTCAGC

152

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGC
TTCTGGATACACCTCACC

153

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTC
TCTGGGTTCTCACTCAGC

154

CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTC
TCTGGGTTCTCACTCAGC

155

CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACTGACCTGCACCTTC
TCTGGGTTCTCACTCAGC

156

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTACCTTCAGT

157

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTACCTTCAGT

158

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

159

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

160

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGAT

161

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

162

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTAGC

163

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

164

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG
TCTGGATTCACCTTCAGT

165

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

166

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCGTCAGT

167

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGAT

168

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

169

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCT
TCTGGATTCACCTTTGGT

170

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGGTTACCGTCAGT

171

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

172

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGGTTACCGTCAGT

173

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTAGT

174

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

175

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGGTTACCTTCAGT

176

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

177

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGAT

178

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTC
TCTGGTTACTCCATCAGC

179

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGC

180

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTC
TATGGTGGTCCCTTCAGT

181

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGC

182

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGT

183

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGT

184

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCGTCAGC

185

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGG
TTCTGGATACAGCTTTACC

186

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAAGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATC
TCCGGGACAGTGTCTCT

187

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCTGGTTACAGTTTACC

Tabla 6. FR2 de cadenas pesadas (definición de Kabat)

188	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
189	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
190	TGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
191	TGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGA
192	TGGGTGCGACAGGCCCGGACAAGCGCTTGAGTGGATGGGA
193	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
194	TGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAGGA
195	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
196	TGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
197	TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
198	TGGATCCGTCAGCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
199	TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
200	TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCA
201	TGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGTCTCA
202	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGC
203	TGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCG
204	TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCT
205	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
206	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
207	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
208	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
209	TGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCG
210	TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
211	TGGGTCCGTCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCT
212	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCA
213	TGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGT
214	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
215	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTTCA
216	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
217	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCC

218	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
219	TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGC
220	TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCA
221	TGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCA
222	TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
223	TGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGG
224	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
225	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
226	TGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
227	TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
228	TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
229	TGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGGG
230	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGA
231	TGGGTGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA

Tabla 7. FR3 de cadenas pesadas (definición de Kabat)

232

**AGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

233

**AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

234

**AGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA**

235

**AGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA**

236

**AGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA**

237

**AGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

238

**AGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCA**

239

**AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

240

AGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

241

AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGAC
ACAGCCACATATTACTGTGCACGG

242

AGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGAC
ACAGCCACATATTACTGTGCACAC

243

AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGAC
ACAGCCACGTATTATTGTGCACGG

244

CGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

245

CGATTCACCATCTCCAGAGAAAAAGCCAAGAAGTCCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGGGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

246

AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA
CACAGCCGTGTATTACTGTACCACA

247

CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAAGTCCCTGTATCTGCAAAAAGAACAGACGGAGAGCCGAGGA
CATGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

248

CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCCTTGTATCACTGTGCGAGA

249

CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

250

CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA

251

CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

252

CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

253

CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGCAAACGAATAGCCTGAGGGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

254

AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGGC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGA

255

CGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGAC
ACCGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

256

CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

257

AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA
CACAGCCGTGTATTACTGTACTAGA

258

CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

259

AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGGGCAGCCTGAGAGCTGAGGAC
ATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

260

CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

261

CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

262

AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGA

263

AGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTACTAGA

264

CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

265

CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGAC
ACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

266

CGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGTGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

267

CGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

268

CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

269

CGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

270

CGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

271

CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

272

CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

273

CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGAC
ACCGCCATGTATTACTGTGCGAGA

274

CGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

275

CGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGAC
ATGGCCATGTATTACTGTGCGAGA

Tabla 8. FR1 de cadenas pesadas (definición de Chothia)

276

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCT

277

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGC
TTCT

278

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTT
TCC

279

CAGG TTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCT
TCT

280

CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCT
TCC

281

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGC
ATCT

282

CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCT

283

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCT

284

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGC
TTCT

285

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTC
TCT

286

CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTC
TCT

287

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACTGACCTGCACCTTC
TCT

288

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

289

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

290

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

291

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

292

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

293

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

294

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

295

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

296

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG
TCT

297

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

298

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

299

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

300

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

301

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCT
TCT

302

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

303

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

304

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

305

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

306

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

307

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

308

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

309

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

310

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTC
TCT

311

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTC
TCT

312

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTC
TAT

313

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCT

314

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCT

315

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCT

316

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCT

317

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGG
TTCT

318

**CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCCTCTCACTCACCTGTGCCATC
TCC**

319

**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCT**

Tabla 9. FR2 de cadenas pesadas (definición de Chothia)

320	TATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
321	TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
322	TTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTT
333	TATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGAGC
324	CGCTACCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCGGACAAGCGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
325	TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATC
326	TCTGCTATGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATC
327	TATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATC
328	TATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATG
329	ATGGGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCCACACATT
330	GTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATT
331	ATGTGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATT
332	TACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATT
333	TACGACATGCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT
334	GCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCGCGTATT
335	AGTGACATGAACTGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGT
336	TATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATT
337	TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATT
338	TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT
339	TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA
340	TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA
341	AGTGACATGAACTGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGT
342	AATGAGATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATT
343	TATACCATGCACTGGGTCCGTCAAGCTCCGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCTTTATT
344	TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATT
345	TATGCTATGAGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGTTTCATT
346	AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATT
347	TATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTTCAGCTATT
348	AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATT
349	TATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA
350	CACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTA
351	TCTGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTTATT
352	TACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATT
353	TATGCCATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATT
354	AACTGGTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTACATC
355	TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATC

356	TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAAATC
357	TACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATC
358	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATC
359	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATC
360	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATC
361	TACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATC
362	GCTGCTTGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACA
363	TATGGTATGAATTGGGTGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGTTC

Tabla 10. FR3 de cadenas pesadas (definición de Chothia)

364

**ACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

365

**ACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

366

**ACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA**

367

**ACAAAATATTCACAGGAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA**

368

**ACCAACTACGCACAGAAATTCAGGACAGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA**

369

**ACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

370

**ACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCA**

371

**GCAA ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

372

**ACAGGCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA**

373

**AAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCCTT
ACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGG**

374

AAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTT
ACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACAC

375

AAATACTACAGCACATCTCTGAAGACCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTT
ACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACGTATTATTGTGCACGG

376

ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

377

ACATACTATCCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTT
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

378

ACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCACA

379

ACGCACTATGTGGACTCCGTGAAGCGCCGATTATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACTCCCTGTATCTG
CAAAGAACAGACGGAGAGCCGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

380

ACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTG
CAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCTTGTATCACTGTGCGAGA

381

ATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

382

ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA

383

AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

384

AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

385

ACGCACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAAACACCCTGTATCTG
CAAACGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

386

ACATACTACGCAGACTCCAGGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGGCACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGA

387

ACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCCCTGTATCTG
CAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACCGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

388

ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

389

ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACTAGA

390

ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

391

ACATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGGGCAGCCTGAGAGCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

392

ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

393

AAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

394

ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGA

395

ACAGCATATGCTGCGTCCGTGAAAGGCAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACTAGA

396

ACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCT
GCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

397

ATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTG
CAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

398

ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGTGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

399

ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

400

ACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

401

ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

402

ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

403

ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

404

ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

405

ACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG
CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGA

406

AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
CAGCTGAAGTCTGTGACTCCCAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

407

CCAACATATGCCAGGGCTTACAGGACGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACTG
CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACATGGCCATGTATTACTGTGCGAGA

Tabla 11. FR4 de Cadena pesada

408	TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA
409	TGGGGCCGTGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCA
410	TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
411	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
412	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
413	TGGGGGCAAGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “gen de anticuerpo de línea germinal” o “fragmento de gen” se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce a reordenamiento génico y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Véase, por ejemplo, Shapiro *et al.*, Crit. Rev. Immunol. 22(3):183-200 (2002); Marchalonis *et al.*, Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la presente invención surge del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de línea germinal tienen más probabilidades que los genes de anticuerpos maduros de conservar estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales característica de individuos en la especie, por tanto menos probabilidades de reconocerse como una fuente foránea cuando se usan terapéuticamente en esa especie.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo humanizado” es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región de entramado (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente” en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el

80%, preferiblemente al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones de entramado son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera como también al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado sólo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

15 El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitación, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y pueden seleccionarse dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en la técnica.

20 No se necesita que las regiones de entramado y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan de manera precisa a las secuencias originales, por ejemplo, la CDR de anticuerpo donador o la región de entramado aceptora pueden mutagenizarse mediante sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido de modo que el residuo de CDR o entramado en ese sitio no corresponde al anticuerpo donador o a la región de entramado aceptora. Sin embargo, tales mutaciones no serán extensas. Habitualmente, al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias FR y CDR originales.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" incluye la célula sujeto particular transfectada o transformada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o progenie potencial de una célula de este tipo. La progenie de una célula de este tipo puede no ser idéntica a la célula original transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias del entorno que pueden producirse en generaciones posteriores o a la integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "se une inmunespecíficamente a un antígeno" y términos análogos se refieren a péptidos, polipéptidos, proteínas (incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas de fusión y anticuerpos) o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno o un fragmento y no se unen específicamente a otros antígenos. Un péptido, polipéptido o proteína que se une inmunespecíficamente a un antígeno puede unirse a otros antígenos con afinidad inferior tal como se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos o fragmentos que se unen inmunespecíficamente a un antígeno pueden tener reactividad cruzada con antígenos relacionados. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos que se unen inmunespecíficamente a un antígeno no tienen reactividad cruzada con otros antígenos.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" en el contexto de un agente proteico (por ejemplo, un péptido, polipéptido o proteína (tal como proteína de fusión o anticuerpo)) se refiere a un agente proteico que está sustancialmente libre de material celular o proteínas, polipéptidos, péptidos y anticuerpos contaminantes de la fuente celular o tisular de la que se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un agente proteico en las que el agente proteico está separado de componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de manera recombinante. Por tanto, un agente proteico que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de un agente proteico que tienen menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10% o el 5% (en peso seco) de proteína, polipéptido o péptido heterólogo (también denominados "proteína contaminante"). Cuando el agente proteico se produce de manera recombinante, preferiblemente también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, el 10% o el 5% del volumen de la preparación de agente proteico. Cuando el agente proteico se produce mediante síntesis química, preferiblemente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separado de precursores químicos u otros productos químicos que participan en la síntesis del agente proteico. Por consiguiente, tales preparaciones de un agente proteico tienen menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10%, el 5% (en peso seco) de compuestos o precursores químicos distintos del agente proteico de interés. En una realización específica, los agentes proteicos dados a conocer en el presente documento están aislados. En una realización preferida, un anticuerpo de la invención está aislado.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" en el contexto de moléculas de ácido nucleico se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, preferiblemente está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de

cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. En una realización específica, las moléculas de ácido nucleico están aisladas. En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo de la invención está aislada. Tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente libre” se refiere a la preparación del ácido nucleico “aislado” que tiene menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10% o el 5% (en peso seco) de ácidos nucleicos heterólogos, y preferiblemente otro material celular, medio de cultivo, precursores químicos u otros productos químicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “en combinación” se refiere al uso de más de una terapia (por ejemplo, más de un agente profiláctico y/o agente terapéutico). El uso del término “en combinación” no limita el orden en el que se administran las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos) a un sujeto. Una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) puede administrarse antes que (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 12 semanas antes), simultáneamente con o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) a un sujeto.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “gestionar”, “que gestiona” y “gestión” se refieren a los efectos beneficiosos que puede obtener un sujeto de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que no da como resultado una cura de la enfermedad. En determinadas realizaciones, a un sujeto se le administran una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) para “gestionar” una enfermedad para prevenir la progresión o el empeoramiento de la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gen de anticuerpo maduro” se refiere a una secuencia genética que codifica para una inmunoglobulina que se expresa, por ejemplo, en un linfocito tal como una célula B, en un hibridoma o en cualquier célula productora de anticuerpos que ha experimentado un proceso de maduración de modo que se expresa la inmunoglobulina particular. El término incluye ADN genómico maduro, ADNc y otras secuencias de ácido nucleico que codifican para tales genes maduros, que se han aislado y/o diseñado por ingeniería recombinante para su expresión en otros tipos de células. Los genes de anticuerpos maduros han experimentado diversas mutaciones y reordenamientos que los distinguen estructuralmente de genes de anticuerpos codificados en todas las células distintas de linfocitos. Los genes de anticuerpos maduros en seres humanos, roedores y muchos otros mamíferos se forman mediante fusión de segmentos de genes V y J en el caso de cadenas ligeras de anticuerpos y fusión de segmentos de genes V, D y J en el caso de cadenas pesadas de anticuerpos. Muchos genes de anticuerpos maduros adquieren mutaciones puntuales tras la fusión, algunas de las cuales aumentan la afinidad de la proteína de anticuerpo por un antígeno específico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o indicada en la farmacopea de los Estados Unidos, la farmacopea europea u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” se refieren a la inhibición del desarrollo o la aparición de un trastorno o a la prevención de la recidiva, aparición o desarrollo de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto que se obtiene como resultado de la administración de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) o la administración de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos).

Tal como se usan en el presente documento, los términos “agente profiláctico” y “agentes profilácticos” se refieren a cualquier agente que puede usarse en la prevención de un trastorno o uno o más de los síntomas del mismo. En determinadas realizaciones, el término “agente profiláctico” se refiere a un anticuerpo de la invención. En determinadas otras realizaciones, el término “agente profiláctico” se refiere a un agente distinto de un anticuerpo de la invención. Preferiblemente, un agente profiláctico es un agente que se sabe que es útil para, o se ha usado o está usándose actualmente para, prevenir o impedir la aparición, desarrollo, progresión y/o gravedad de un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, agente profiláctico) que es suficiente para dar como resultado la prevención del desarrollo, recidiva o aparición de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, o para potenciar o mejorar el/los efecto(s) profiláctico(s) de otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico).

Tal como se usa en el presente documento, el término “protocolo” se refiere a un régimen para administrar dosis y determinar el tiempo de administración de una o más terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos) que tiene un efecto terapéutico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “efectos secundarios” abarca efectos adversos y no deseados de un agente profiláctico o terapéutico. Los efectos secundarios siempre son no deseados, pero los efectos no deseados no son necesariamente adversos. Un efecto adverso de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) puede ser dañino, incómodo o peligroso.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “moléculas pequeñas” y términos análogos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácido, polinucleótidos, análogos de polinucleótido, nucleótidos, análogos de nucleótido, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000
10 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales agentes.

15 Tal como se usan en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se usan de manera intercambiable. Tal como se usan en el presente documento, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren a un animal, preferiblemente un mamífero incluyendo uno que no es un primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, un chimpancé y un ser humano), y lo más preferiblemente un ser humano. En una realización, el sujeto es un animal no humano tal como un ave (por ejemplo, una codorniz, pollo o pavo), un animal de granja (por ejemplo, una vaca, caballo, cerdo u oveja), una mascota (por ejemplo, un gato, perro o cobaya) o un animal de laboratorio (por ejemplo, un modelo de animal para un trastorno). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano (por ejemplo, un bebé, niño, adulto o anciano).

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “sinérgico” se refiere a una combinación de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que es más eficaz que los efectos aditivos de dos o más terapias individuales cualesquiera (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos) permite el uso de dosificaciones inferiores de una o más de terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) y/o la administración menos frecuente de dichas terapias a un sujeto con un trastorno. La capacidad de usar dosificaciones inferiores de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) y/o administrar dichas terapias con menor frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de dichas terapias a un sujeto sin reducir la eficacia de dichas terapias en la prevención o el tratamiento de un trastorno. Además, un efecto sinérgico
30 puede dar como resultado una eficacia mejorada de las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) en la prevención o el tratamiento de un trastorno. Finalmente, el efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier terapia individual.

40 Tal como se usan en el presente documento, los términos “agente terapéutico” y “agentes terapéuticos” se refieren a cualquier agente que puede usarse en la prevención, tratamiento, gestión o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. En determinadas realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a un anticuerpo de la invención. En determinadas otras realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a un agente distinto de un anticuerpo de la invención. Preferiblemente, un agente terapéutico es un agente que se sabe que es útil para, o se ha usado o está usándose actualmente para, la prevención, tratamiento, gestión o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, un anticuerpo de la invención), que es suficiente para reducir la gravedad de un trastorno, reducir la duración de un trastorno, mejorar uno o más síntomas de un trastorno, prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno o potenciar o mejorar el/los efecto(s) terapéutico(s) de otra terapia.

55 Tal como se usan en el presente documento, los términos “terapias” y “terapia” pueden referirse a cualquier protocolo, método y/o agente que pueden usarse en la prevención, tratamiento, gestión y/o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. En determinadas realizaciones, los términos “terapia” y “terapia” se refieren a terapia antiviral, terapia antibacteriana, terapia antifúngica, agente anticancerígeno, terapia biológica, terapia de soporte y/u otras terapias útiles en el tratamiento, gestión, prevención o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, un profesional médico tal como un médico.

60 Tal como se usan en el presente documento, los términos “tratar”, “tratamiento” y “que trata” se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno o mejora de uno o más síntomas del mismo que se obtiene como resultado de la administración de una o más terapias (incluyendo, pero sin limitarse a, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos).

65 3.2 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Secuencias de ácido nucleico y proteína de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal de ratón anti-EphA2 humano B233. Las regiones CDR1, 2 y 3 tal como se definen por Kabat están en recuadros. Las secuencias de aminoácidos completas de las cadenas variables pesada (V_H) y ligera (V_L) se facilitan usando el código de una letra convencional.

5
Figura 2. Vector de fago usado para el examen de las bibliotecas de intercambio de región de entramado y la expresión de los fragmentos Fab correspondientes. El ADN monocatenario, purificado por estreptavidina, de cada uno de los genes de V_L y V_H se hibrida con el vector mediante mutagénesis por hibridación usando homología en las regiones líder/ C_{κ} del gen 3 y líder/ $C_{\kappa 1}$ del gen 3, respectivamente. El sitio Xba1 único en los bucles palindrómicos
10 permite la eliminación del vector original. Entonces se expresan los genes de V_H y V_L en marco con el primer dominio constante de la cadena pesada $\kappa 1$ humana y el dominio constante de la cadena ligera kappa (κ) humana, respectivamente.

15
Figura 3. Secuencias de proteína de clones humanizados, con intercambio de región de entramado, del anticuerpo monoclonal anti-EphA2 humano B233 aislado tras examinar las bibliotecas A y B. Las regiones CDR1, 2 y 3 tal como se definen por Kabat están en recuadros. Las secuencias de aminoácidos completas de las cadenas variables pesada (V_H) y ligera (V_L) se facilitan usando el código de una letra convencional.

20
Figura 4. Titulación mediante ELISA usando extractos de Fab sobre Fc contra EphA2 humano inmovilizado.

Figura 5. Análisis de secuencia de anticuerpos con intercambio de región de entramado. Se calculó la identidad en porcentaje a nivel de aminoácido para cada región de entramado de anticuerpo individual usando el mAb B233 como referencia.

25 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de modificación por reingeniería o remodelación de un anticuerpo de una primera especie, en el que el anticuerpo modificado por reingeniería o remodelado no provoca una respuesta inmunitaria no deseada en una segunda especie, y el anticuerpo modificado mediante reingeniería o remodelado
30 conserva sustancialmente la misma capacidad de unión a antígeno del anticuerpo de la primera especie. Puede construirse una biblioteca combinatoria que comprende las CDR del anticuerpo de la primera especie fusionadas en marco con regiones de entramado de un banco de regiones de entramado derivadas de una segunda especie y examinarse para seleccionar el anticuerpo modificado deseado.

35 Las células pueden comprender, contener o diseñarse por ingeniería para expresar las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento. Un método de producción de una región variable de cadena pesada humanizada tal como se describe en el presente documento puede comprender expresar la secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena pesada humanizada en una célula descrita en el presente documento. Un método de producción de una región variable de cadena ligera humanizada puede
40 comprender expresar la secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena ligera humanizada en una célula descrita en el presente documento. Un método de producción de un anticuerpo humanizado que se une inmunoespecíficamente a un antígeno puede comprender expresar la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) para el anticuerpo humanizado contenido en la célula descrita en el presente documento.

45 Pueden producirse anticuerpos humanizados mediante los métodos descritos en el presente documento. Una composición puede comprender un anticuerpo humanizado producido mediante los métodos descritos en el presente documento y un portador, diluyente o excipiente, tales composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas en una forma adecuada para su uso previsto.

50 Para claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la sección de la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones:

55 (i) construcción de un banco global de regiones de entramado aceptoras

(ii) selección de CDR

(iii) construcción de sub-bibliotecas combinatorias

60 (iv) construcción de bibliotecas combinatorias

(v) expresión de las bibliotecas combinatorias

(vi) selección de anticuerpos humanizados

65 (vii) producción y caracterización de anticuerpos humanizados

(viii) conjugados de anticuerpos

(ix) usos de las composiciones

5

(x) administración y formulaciones

(xi) dosificación y frecuencia de administración

10

(xii) ensayos biológicos

(xiii) kits

(xiv) artículo de fabricación

15

2.2 Construcción de un banco global de regiones de entramado aceptoras

Según la presente invención, una región de cadena ligera variable y/o región de cadena pesada variable de un anticuerpo no humano donador puede humanizarse fusionando entre sí secuencias de ácido nucleico que codifican para regiones de entramado (FR1, FR2, FR3, FR4 de la cadena ligera, y FR1, FR2, FR3, FR4 de la cadena pesada) de un anticuerpo humano aceptor y secuencias de ácido nucleico que codifican para regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3 de la cadena ligera, y CDR1, CDR2, CDR3 de la cadena pesada) del anticuerpo donador. Preferiblemente, la cadena ligera de anticuerpo humanizado comprende FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Una cadena pesada de anticuerpo humanizado comprende FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Cada región de entramado humana aceptora (FR1, 2, 3, 4 de cadena ligera, y FR1, 2, 3, 4 de cadena pesada) puede generarse a partir de sub-bancos de FR para la cadena ligera y sub-bancos de FR para la cadena pesada, respectivamente. Un banco global de regiones de entramado humanas aceptoras comprende dos o más sub-bancos de FR.

20

25

30

2.2.1 Generación de sub-bancos para las regiones de entramado de cadena ligera

Se construyen los sub-bancos 1, 2, 3 y 4 de cadenas ligeras, en los que el sub-banco 1 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una FR1 de cadena ligera; el sub-banco 2 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una FR2 de cadena ligera; el sub-banco 3 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una FR3 de cadena ligera; y el sub-banco 4 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una FR4 de cadena ligera. En algunas realizaciones, las secuencias de FR se obtienen o se derivan de secuencias de anticuerpos humanos funcionales (por ejemplo, un anticuerpo conocido en la técnica y/o disponible comercialmente). En algunas realizaciones, las secuencias de FR se derivan de secuencias de cadena ligera de línea germinal humana. En una realización, las secuencias de FR del sub-banco se derivan de secuencias de cadena kappa de línea germinal humana. En otra realización, las secuencias de FR del sub-banco se derivan de secuencias de cadena lambda de línea germinal humana.

35

40

45

A modo de ejemplo pero no de limitación, lo siguiente describe un método de generación de 4 sub-bancos de FR de cadena ligera usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que se usan secuencias de cadena kappa de línea germinal humana como moldes. Los sub-bancos de FR de cadena ligera 1, 2 y 3 (que codifican para FR1, 2, 3 respectivamente) abarcan 46 secuencias de cadena kappa de línea germinal humana (A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 y O8). Véase Kawasaki *et al.*, 2001, Eur. J. Immunol., 31:1017-1028; Schable y Zachau, 1993, Biol. Chem. Hoppe Seiler 374: 1001-1022; y Brensing-Kuppers *et al.*, 1997, Gene 191:173-181. Las secuencias se resumen en el sitio web del NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VK&seqType=nucleotide. El sub-banco de FR de cadena ligera 4 (que codifica para FR4) abarca 5 secuencias de cadena kappa de línea germinal humana (Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5). Véase Hieter *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-1522. Las secuencias se resumen en el sitio web del: www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=JK&seqType=nucleotide.

50

55

60

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR1 de cadena ligera se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 12 y la tabla 13 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

Tabla 12. Cebadores directos de FR1 de cadena ligera (para el sub-banco 1)

414	FR1L1	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTCAACC
-----	-------	--

ES 2 458 636 T3

415	FR1L2	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
416	FR1L3	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCGTCACCC
417	FR1L4	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
418	FR1L5	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCGTCACCC
419	FR1L6	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCC
420	FR1L7	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
421	FR1L8	GAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTTGTCTATCACCC
422	FR1L9	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCCTGTCACCC
423	FR1L10	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTC
424	FR1L11	GATGTTGTGATGACACAGTCTCCAGCTTTCCTCTCTGTGACTC
425	FR1L12	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
426	FR1L13	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTC
427	FR1L14	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
428	FR1L15	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTCATGTCAGCGACTC
429	FR1L16	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG
430	FR1L17	GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
431	FR1L18	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTG
432	FR1L19	AACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTGCCATGTCTGCATCTG
433	FR1L20	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG
434	FR1L21	GAAATAGTGATGATGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTC
435	FR1L22	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
436	FR1L23	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTG
437	FR1L24	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTC
438	FR1L25	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC
439	FR1L36	GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCTTTCCTGTCTGCATCTG
440	FR1L27	GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTG
441	FR1L28	GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTA
442	FR1L29	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
443	FR1L30	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTG
444	FR1L31	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC
445	FR1L32	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCCTGTCTGCATCTG
446	FR1L33	GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCATTCTCTGCATCTA
447	FR1L34	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
448	FR1L35	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
449	FR1L36	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
450	FR1L37	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
451	FR1L38	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
452	FR1L39	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
453	FR1L40	GAAATTGTAATGACACAGTCTCCACCCACCCTGTCTTTGTCTC
454	FR1L41	GAAATTGTAATGACACAGTGTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC
455	FR1L42	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC
456	FR1L43	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC

ES 2 458 636 T3

457	FR1L44	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTC
458	FR1L45	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
459	4FR1L46	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC

Tabla 13. Cebadores inversos de FR1 de cadena ligera (para el sub-banco 1)

460	FR1L1'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
461	FR1L2'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
462	FR1L3'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
463	FR1L4'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
464	FR1L5'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
465	FR1L6'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACAGGTGAGGAGAGTG
466	FR1L7'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
467	FR1L8'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGATAGACAAGGAGAGTG
468	FR1L9'	GAAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACAGGCGAGGAGAGTG
469	FR1L10'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCTTTGGAGTCACAGACTGAAAGTCTG
470	FR1L11'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCCCTGGAGTCACAGAGAGGAAAGCTG
471	FR1L12'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
472	FR1L13'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCTTTGGAGTCACAGACTGAAAGTCTG
473	FR1L14'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
474	FR1L15'	GCAGGAGATGTTGACTTTGTCTCCTGGAGTCGCTGACATGAATGCTG
475	FR1L16'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGTGAGGATG
476	FR1L17'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
477	FR1L18'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGTGAAG
478	FR1L19'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACATGGCAGATG
479	FR1L20'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGTGAGGATG
480	FR1L21'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACACAGACAGGGTGGCTG
481	FR1L22'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
482	FR1L23'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACACAGAAGATG
483	FR1L24'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACACAGACAGGGTGGCTG
484	FR1L25'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG
485	FR1L36'	GCAAATGATACTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGAAAGATG
486	FR1L27'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGAATG
487	FR1L28'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTGTAGATGCAGAGAGTAAGGATG
488	FR1L29'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
489	FR1L30'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACACGGAAGATG
490	FR1L31'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG
491	FR1L32'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGAAAGGATG
492	FR1L33'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTGTAGATGCAGAGAATGAGGATG
493	FR1L34'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
494	FR1L35'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
495	FR1L36'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
496	FR1L37'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
497	FR1L38'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG

ES 2 458 636 T3

498	FR1L39'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
499	FR1L40'	GCAGGAGAGGGTGACTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGGTG
500	FR1L41'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG
501	FR1L42'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG
502	FR1L43'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGCCTG
503	FR1L44'	GCAGTTGATGGTGGCCCTCTCGCCAGAGACACAGCCAGGGAGTCTG
504	FR1L45'	GCAGGAGATGGAGCCGGCTCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
505	FR1L46'	GCAGGAGATGGAGCCGGCTCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (46 en total): FR1L1/FR1L1', FR1L2/FR1L2', FR1L3/FR1L3', FR1L4/FR1L4', FR1L5/FR1L5', FR1L6/FR1L6', FR1L7/FR1L7', FR1L8/FR1L8', FR1L9/FR1L9', FR1L10/FR1L10', FR1L11/FR1L11', FR1L12/FR1L12', FR1L13/FR1L13', FR1L14/FR1L14', FR1L15/FR1L15', FR1L16/FR1L16', FR1L17/FR1L17', FR1L18/FR1L18', FR1L19/FR1L19', FR1L20/FR1L20', FR1L21/FR1L21', FR1L22/FR1L22', FR1L23/FR1L23', FR1L24/FR1L24', FR1L25/FR1L25', FR1L26/FR1L26', FR1L27/FR1L27', FR1L28/FR1L28', FR1L29/FR1L29', FR1L30/FR1L30', FR1L31/FR1L31', FR1L32/FR1L32', FR1L33/FR1L33', FR1L34/FR1L34', FR1L35/FR1L35', FR1L36/FR1L36', FR1L37/FR1L37', FR1L38/FR1L38', FR1L39/FR1L39', FR1L40/FR1L40', FR1L41/FR1L41', FR1L42/FR1L42', FR1L43/FR1L43', FR1L44/FR1L44', FR1L45/FR1L45' y FR1L46/FR1L46'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 1.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR2 de cadena ligera se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 14 y la tabla 15 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

15

Tabla 14. Cebadores directos de FR2 de cadena ligera (para el sub-banco 2)

506	FR2L1	TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAA
507	FR2L2	TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAA
508	FR2L3	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAC
509	FR2L4	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC
510	FR2L5	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCAC
511	FR2L6	TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAA
512	FR2L7	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC
513	FR2L8	TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCA
514	FR2L9	TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAA
515	FR2L10	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAA
516	FR2L11	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAAGCCCCAA
517	FR2L12	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCCTA
518	FR2L13	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAA
519	FR2L14	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
520	FR2L15	TGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAGCTGCTA
521	FR2L16	TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
522	FR2L17	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
523	FR2L18	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
524	FR2L19	TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTA
525	FR2L20	TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTA
526	FR2L21	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
527	FR2L22	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCCTA
528	FR2L23	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
529	FR2L24	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA

530	FR2L25	TGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCCA
531	FR2L26	TGGTATCTGCAGAAAACCAGGGAAATCCCCTA
532	FR2L27	TGGTATCAGCAAAAACCAGCAAAGCCCCTA
533	FR2L28	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTG
534	FR2L29	TGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCTCCTA
535	FR2L30	TGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
536	FR2L31	TGGTACCAACAGAAAACCTGGCCAGGCTCCCA
537	FR2L32	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
538	FR2L33	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
539	FR2L34	TGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
540	FR2L35	TGGTATCGGCAGAAAACCAGGGAAAGTTCCTA
541	FR2L36	TGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
542	FR2L37	TGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
543	FR2L38	TGGTATCGGCAGAAAACCAGGGAAAGTTCCTA
544	FR2L39	TGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
545	FR2L40	TGGTATCAGCAGAAAACCTGGCCAGGCGCCCA
546	FR2L41	TGGTACCAGCAGAAAACCTGGGCAGGCTCCCA
547	FR2L42	TGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCTGGCGCCCA
548	FR2L43	TGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCCA
549	FR2L44	TGGTACCAGCAGAAAACCAGGACAGCCTCCTA
550	FR2L45	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC
551	FR2L46	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC

Tabla 15. Cebadores inversos de FR2 de cadena ligera (para el sub-banco 2)

552	FR2L1'	ATAAATTAGGCGCCTTGGAGATTGGCCTGGCCTCT
553	FR2L2'	ATAAATTAGGCGCCTTGGAGATTGGCCTGGCCTCT
554	FR2L3'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGGCCTGGCTTCT
555	FR2L4'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT
556	FR2L5'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGGCTGGCCTGGCTTCT
557	FR2L6'	ATAAATrAGGAGTCTTGGAGGCTGGCCTGGCCTCT
558	FR2L7'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT
559	FR2L8'	ATAGATCAGGAGTGTGGAGACTGGCCTGGCTTTCT
560	FR2L9'	ATAAATTAGGAGTCTTGGAGGCTGGCCTGGCCTCT
561	FR2L10'	CTTGATGAGGAGCTTTGGAGACTGATCTGGTTTCT
562	FR2L11'	CTTGATGAGGAGCTTTGGGGCTTGATCTGGTTTCT
563	FR2L12'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACTTTCCCTGGTTTCT
564	FR2L13'	CTTGATGAGGAGCTTTGGAGACTGATCTGGTTTCT
565	FR2L14'	ATAGATCAGGCGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
566	FR2L15'	TTGAATAATGAAAATAGCAGCTTCTCCTGGTTTCT
567	FR2L16'	ATAGATCAGGGACTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
568	FR2L17'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
569	FR2L18'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
570	FR2L19'	ATAGATCAGGTGCTTAGGGACTTTCCCTGGTTTCT

571	FR2L20'	ATAGATCAGGGACTTAGGGGCTTCTCTGGTTTCT
572	FR2L21'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
573	FR2L22'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAGCTCCCTGGTTTCT
574	FR2L23'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
575	FR2L24'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
576	FR2L25'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
577	FR2L26'	ATAGAGGAAGAGCTTAGGGGATTCCCTGGTTTCT
578	FR2L27'	ATAGATGAAGAGCTTAGGGGCTTTTGCTGGTTTTT
579	FR2L28'	ATAGATCAGGAGCTCACGGGCTTCCCTGGTTTTT
580	FR2L29'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAGCTTCCCTGGTTTCT
581	FR2L30'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
582	FR2L31'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
583	FR2L32'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTTT
584	FR2L33'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTTT
585	FR2L34'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
586	FR2L35'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACTTCCCTGGTTTCT
587	FR2L36'	GTAGATCAGGAGCTTAGGGGCT7TCCCTGGTTTCT
588	FR2L37'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
589	FR2L38'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACTTCCCTGGTTTCT
590	FR2L39'	GTAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
591	FR2L40'	ATAGATGAGGAGCCTGGGCGCCTGGCCAGGTTTCT
592	FR2L41'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGCCAGGTTTCT
593	FR2L42'	ATAGATGAGGAGCCTGGGCGCCAGGCCAGGTTTCT
594	FR2L43'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
595	FR2L44'	GTAATGAGCAGCTTAGGAGGCTGCCTGGTTTCT
596	FR2L45'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT
597	FR2L46'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (46 en total): FR2L1/FR2L1', FR2L2/FR2L2', FR2L3/FR2L3', FR2L4/FR2L4', FR2L5/FR2L5', FR2L6/FR2L6', FR2L7/FR2L7', FR2L8/FR2L8', FR2L9/FR2L9', FR2L10/FR2L10', FR2L11/FR2L11', FR2L12/FR2L12', FR2L13/FR2L13', FR2L14/FR2L14', FR2L15/FR2L15', FR2L16/FR2L16', FR2L17/FR2L17', FR2L18/FR2L18', FR2L19/FR2L19', FR2L20/FR2L20', FR2L21/FR2L21', FR2L22/FR2L22', FR2L23/FR2L23', FR2L24/FR2L24', FR2L25/FR2L25', FR2L26/FR2L26', FR2L27/FR2L27', FR2L28/FR2L28', FR2L29/FR2L29', FR2L30/FR2L30', FR2L31/FR2L31', FR2L32/FR2L32', FR2L33/FR2L33', FR2L34/FR2L34', FR2L35/FR2L35', FR2L36/FR2L36', FR2L37/FR2L37', FR2L38/FR2L38', FR2L39/FR2L39', FR2L40/FR2L40', FR2L41/FR2L41', FR2L42/FR2L42', FR2L43/FR2L43', FR2L44/FR2L44', FR2L45/FR2L45' y FR2L46/FR2L46'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 2.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR3 de cadena ligera se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 16 y la tabla 17 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

Tabla 16. Cebadores directos de FR3 de cadena ligera (para el sub-banco 3)

	FR3L1
598	GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTACACTGAAAATCAG
	FR3L2
599	GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTACACTGAAAATCAG

ES 2 458 636 T3

600 FR3L3
GGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTTCACTGAAAATCAG

601 FR3L4
GGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAG

602 FR3L5
GGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTTCACTGAAAATCAG

603 FR3L6
GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTTCACTGAAAATCAG

604 FR3L7
GGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAG

605 FR3L8
GGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTTCACTGAAAATCAG

606 FR3L9
GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTTCACTGAAAATCAG

607 FR3L10
GGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTCACTCACCATCAA

608 FR3L11
GGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTCACTTACCATCAG

609 FR3L12
GGGGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTCACTCTCACCATCAG

610 FR3L13
GGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTCACTCACCATCAA

611 FR3L14
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTTCACTCTCACAATCAG

612 FR3L15
GGAATCCCACCTCGATTTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTCACTCACAATTA

613 FR3L16
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTCACTCTCACCATCAG

614 FR3L17
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTTCACTCTCACCATCAG

615 FR3L18
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTTCACTCTCACCATCAG

616 FR3L19
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTTCACTCACAATCAG

617 FR3L20
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTCACTCTCACCATCAG

ES 2 458 636 T3

618 FR3L21
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG

619 FR3L22
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

620 FR3L23
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAG

621 FR3L24
GGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG

622 FR3L25
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGCCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

623 FR3L26
GGGGTCTCATCGAGGTTTCAGTGGCAGGGGATCTGGGACGGATTTCACTCTCACCATCAT

624 FR3L27
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAG

625 FR3L28
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

626 FR3L29
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

627 FR3L30
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

628 FR3L31
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

629 FR3L32
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTTCACTCTCACAATCAG

630 FR3L33
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

631 FR3L34
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

632 FR3L35
GGAGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAG

633 FR3L36
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAG

634 FR3L37
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

635 FR3L38
GGAGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAG

ES 2 458 636 T3

	FR3L39
636	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAG
	FR3L40
637	AGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
	FR3L41
638	GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
	FR3L42
639	GGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
	FR3L43
640	GGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
	FR3L44
641	GGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
	FR3L45
642	GGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTTCAGGCACTGATTTTCACTGAAAAATCAG
	FR3L46
643	GGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTTCAGGCACTGATTTTCACTGAAAAATCAG

Tabla 17. Cebadores inversos de FR3 de cadena ligera (para el sub-banco 3)

644	FR3L1'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
645	FR3L2'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
646	FR3L3	TCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCGGCTGATTTTCAGTGTGAAA
647	FR3L4'	GCAGTAATAAACCCCAACATCGTCAGCCTCCACTCTGCTGATTTTCAGTGTAAAA
648	FR3L5'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCGGCTGATTTTCAGTGTGAAA
649	FR3L6'	GCAGTAATAAACCCCGACATCCTCAGCTTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
650	FR3L7'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCTGATTTTCAGTGTAAAA
651	FR3L8'	GCAGTAATAAACTCCAAAATCCTCAGCCTCCACCCGGCTGATTTTCAGTGTGAAA
652	FR3L9'	GCAGTAATAAACCCCGACATCCTCAGCTTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
653	FR3L10'	ACAGTAATACGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGCTATTGATGGTGAGGGTGAAA
654	FR3L11'	ACAGTAATATGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGCTACTGATGGTAAAGGTGAAA
655	FR3L12'	ACAGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
656	FR3L13'	ACAGTAATACGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGGTATTGATGGTGAGGGTGAAA
657	FR3L14'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTGTGAGAGTGAAT
658	FR3L15'	ACAGAAGTAATATGCAGCATCCTCAGATTCTATGTTATTAATTGTGAGGGTAAAA
659	FR3L16'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
660	FR3L17'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
661	FR3L18'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCATCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAT
662	FR3L19'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTGTGAGAGTGAAT
663	FR3L20'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
664	FR3L21'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAC
665	FR3L22'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
666	FR3L23'	ACAATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA

667	FR3L24'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAC
668	FR3L25'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTCTAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
669	FR3L26'	ACAGTAATAAGCTGCAAAATCTTCAGGCTTCAGGCTGATGATGGTGAGAGTGAAA
670	FR3L27'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGTA
671	FR3L28'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCAACTGATGGTGAGAGTGAAA
672	FR3L29'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
673	FR3L30'	ACAATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
674	FR3L31'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTCTAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
675	FR3L32'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTGTGAGAGTGAAT
676	FR3L33'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCAGCTGATGGTGAGAGTGAAA
677	FR3L34'	ACAGTAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
678	FR3L35'	ACCGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA
679	FR3L36'	ACAGTAATATGTTGCAATATCITCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAAAGTAAAA
680	FR3L37'	ACAGTAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
681	FR3L38'	ACCGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA
682	FR3L39'	ACAGTAATATGTTGCAATATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAAAGTAAAA
683	FR3L40'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
684	FR3L41'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
685	FR3L42'	ACAGTAATACACTGCAAAATCTTCAGGCTCCAGTCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
686	FR3L43'	ACAGTAATACACTGCAAAATCTTCAGGCTCCAGTCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
687	FR3L44'	ACAGTAATAAACTGCCACATCTTCAGCCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
688	FR3L45'	GCAGTAATAAACTCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
689	FR3L46'	GCAGTAATAAACTCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (46 en total): FR3L1/FR3L1', FR3L2/FR3L2', FR3L3/FR3L3', FR3L4/FR3L4', FR3L5/FR3L5', FR3L6/FR3L6', FR3L7/FR3L7', FR3L8/FR3L8', FR3L9/FR3L9', FR3L10/FR3L10', FR3L11/FR3L11', FR3L12/FR3L12', FR3L13/FR3L13', FR3L14/FR3L14', FR3L15/FR3L15', FR3L16/FR3L16', FR3L17/FR3L17', FR3L18/FR3L18', FR3L19/FR3L19', FR3L20/FR3L20', FR3L21/FR3L21', FR3L22/FR3L22', FR3L23/FR3L23', FR3L24/FR3L24', FR3L25/FR3L25', FR3L26/FR3L26', FR3L27/FR3L27', FR3L28/FR3L28', FR3L29/FR3L29', FR3L30/FR3L30', FR3L31/FR3L31', FR3L32/FR3L32', FR3L33/FR3L33', FR3L34/FR3L34', FR3L35/FR3L35', FR3L36/FR3L36', FR3L37/FR3L37', FR3L38/FR3L38', FR3L39/FR3L39', FR3L40/FR3L40', FR3L41/FR3L41', FR3L42/FR3L42', FR3L43/FR3L43', FR3L44/FR3L44', FR3L45/FR3L45' y FR3L46/FR3L46'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 3.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR4 de cadena ligera se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 18 y la tabla 19 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

Tabla 18. Cebadores directos de FR4 de cadena ligera (para el sub-banco 4)

690	FR4L1	TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAA
691	FR4L2	TTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
692	FR4L3	TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
693	FR4L4	TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
694	FR4L5	TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA

Tabla 19. Cebadores inversos de FR4 de cadena ligera (para el sub-banco 4)

695	FR4L1'	TTTGATTTCCACCTTGGTCCCCTTGCCGAA
696	FR4L2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTTGCCAA

697	FR4L3'	TTTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGCCGAA
698	FR4L4'	TTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAA
699	FR4L5'	TTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGGCCGAA

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (5 en total): FR4L1/FR4L1', FR4L2/FR4L2', FR4L3/FR4L3', FR4L4/FR4L4' o FR4L5/FR4L5'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 4.

5

2.2.2 Generación de sub-bancos para las regiones de entramado de cadena pesada

En algunas realizaciones, se construyen sub-bancos de FR de cadena pesada 5, 6, 7 y 11 en los que el sub-banco 5 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una FR1 de cadena pesada; el sub-banco 6 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una FR2 de cadena pesada; el sub-banco 7 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una FR3 de cadena pesada; y el sub-banco 11 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una FR4 de cadena pesada, respectivamente; en los que las FR1, FR2 y FR3 de cadena pesada se definen según la definición de Kabat para CDR H1 y H2. En algunas realizaciones, las secuencias de FR se derivan de secuencias de anticuerpos humanos funcionales. En otras realizaciones, las secuencias de FR se derivan de secuencias de cadena pesada de línea germinal humana.

20

A modo de ejemplo pero no de limitación, lo siguiente describe un método de generación de 4 sub-bancos de FR de cadena pesada usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que se usan secuencias de cadena pesada de línea germinal humana como moldes. Los sub-bancos de FR de cadena pesada 5, 6 y 7 (que codifican para FR1, 2, 3 respectivamente) abarcan 44 secuencias de cadena pesada de línea germinal humana (VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1 y VH7-81). Véase Matsuda *et al.*, 1998, J. Exp. Med., 188:1973-1975. Las secuencias se resumen en el sitio web del NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chain-Type=VH&seqType=nucleotide. El sub-banco de FR de cadena pesada 11 (que codifica para FR4) abarca 6 secuencias de cadena pesada de línea germinal humana (JH1, JH2, JH3, JH4, JH5 y JH6). Véase Ravetch *et al.*, 1981, Cell 27 (3 Pt 2): 583-591. Las secuencias se resumen en el sitio web del NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chain-Type=JH&seqType=nucleotide.

30

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR1 de cadena pesada (según la definición de Kabat) se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 20 y la tabla 21 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

35

40 Tabla 20. Cebadores directos de FR1 de cadena pesada (definición de Kabat) (para el sub-banco 5):

	FR1HK1
700	CAGGTT CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
	FR1HK2
701	CAGGTG CAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
	FR1HK3
702	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
	FR1HK4
703	CAGGTT CAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
	FR1HK5
704	CAGATG CAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCCTCAGTGAAGGT
	FR1HK6
705	CAGGTG CAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT

ES 2 458 636 T3

706 FR1HK7
CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGT

707 FR1HK8
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGT

708 FR1HK9
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT

709 FR1HK10
CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCAGCT

710 FR1HK11
CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCAGCT

711 FR1HK12
CAGGTCACCTGAGGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACT

712 FR1K13
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACT

713 FR1HK14
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

714 FR1HK15
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGAGT

715 FR1HK16
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

716 FR1HK17
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

717 FR1HK18
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

718 FR1HK19
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

719 FR1HK20
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT

720 FR1HK21
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT

721 FR1HK22
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACT

722 FR1HK23
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACT

723 FR1HK24
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

ES 2 458 636 T3

724 FR1HK25
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

725 FR1HK26
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACT

726 FR1HK27
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

727 FR1HK28
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

728 FR1HK29
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

729 FR1HK30
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

730 FR1HK31
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACT

731 FR1HK32
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACT

732 FR1HK33
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGCGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

733 FR1HK34
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACT

734 FR1HK35
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCT

735 FR1HK36
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCT

736 FR1HK37
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

737 FR1HK38
CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

738 FR1HK39
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

739 FR1HK40
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

740 FR1HK41
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

741 FR1HK42
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGAT

ES 2 458 636 T3

	FR1HK43	
742		CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACT
	FR1HK44	
743		CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT

Tabla 21. Cebadores inversos de FR1 de cadena pesada (definición de Kabat) (para el sub-banco 5):

744	FR1HK1'	GGTAAAGGTGTAACCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
745	FR1HK2'	GGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
746	FR1HK3'	AGTGAGGGTGTATCCGGAACCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
747	FR1HK4'	AGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
748	FR1HK5'	GGTGAAGGTGTATCCGGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGACCCAGTC
749	FR1HK6'	GGTGAAGGTGTATCCAGATGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
750	FR1HK7'	AGTAAAGGTGAATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGTCCCAGGC
751	FR1HK8'	GCTGAAGGTGCCTCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCAACGAGGACCCAGGC
752	FR1HK9'	GGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
753	FR1HK10'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGACGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTCTGTGGGT
754	FR1HK11'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGAAGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTGTGTGGGT
755	FR1HK12'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGAAGGTGCAGGTCAGTGTGAGGGTCTGTGTGGGT
756	FR1HK13'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCTCCAGGC
757	FR1HK14'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
758	FR1HK15'	ACTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTAAGGGACCCCCAGGC
759	FR1HK16'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
760	FR1HK17'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
761	FR1HK18'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
762	FR1HK19'	GCTAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
763	FR1HK20'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGC
764	FR1HK21'	ACTGAAGGTGAATCCAGACGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGC
765	FR1HK22'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGATCCCCAGGC
766	FR1HK23'	ACTGACGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCTAGGC
767	FR1HK24'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
768	FR1HK25'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
769	FR1HK26'	ACCAAAGGTGAATCCAGAAGCTGTACAGGAGAGTCTCAGGGACCGCCCTGGC
770	FR1HK27'	ACTGACGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
771	FR1HK28'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
772	FR1HK29'	ACTGACGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
773	FR1HK30'	ACTAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
774	FR1HK31'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCTCCAGGC
775	FR1HK32'	ACTGAAGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTTTCAGGGACCCCCAGGC
776	FR1HK33'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC
777	FR1HK34'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTGCCAGGC
778	FR1HK35'	GCTGATGGAGTAACCAGAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTGTCCGAAGGC
779	FR1HK36'	GCTGATGGAGCCACCAGAGACAGTACAGGTGAGGGACAGGGTCTGTGAAGGC

780	FR1HK37'	ACTGAAGGACCCACCATAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
781	FR1HK38'	GCTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
782	FR1HK39'	ACTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
783	FR1HK40'	ACTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
784	FR1HK41'	GCTGACGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
785	FR1HK42'	GGTAAAGCTGTATCCAGAACCCTTACAGGAGATCTTCAGAGACTCCCCGGGC
786	FR1HK43'	AGAGACACTGTCCCCGGAGATGGCACAGGTGAGTGAGAGGGTCTGCGAGGGC
787	FR1HK44'	GGTGAAACTGTAACCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (44 en total): FR1HK1/FR1HK1', FR1HK2/FR1HK2', FR1HK3/FR1HK3', FR1HK4/FR1HK4', FR1HK5/FR1HK5', FR1HK6/FR1HK6', FR1HK7/FR1HK7', FR1HK8/FR1HK8', FR1HK9/FR1HK9', FR1HK10/FR1HK10', FR1HK11/FR1HK11', FR1HK12/FR1HK12', FR1HK13/FR1HK13', FR1HK14/FR1HK14', FR1HK15/FR1HK15', FR1HK16/FR1HK16', FR1HK17/FR1HK17', FR1HK18/FR1HK18', FR1HK19/FR1HK19', FR1HK20/FR1HK20', FR1HK21/FR1HK21', FR1HK22/FR1HK22', FR1HK23/FR1HK23', FR1HK24/FR1HK24', FR1HK25/FR1HK25', FR1HK26/FR1HK26', FR1HK27/FR1HK27', FR1HK28/FR1HK28', FR1HK29/FR1HK29', FR1HK30/FR1HK30', FR1HK31/FR1HK31', FR1HK32/FR1HK32', FR1HK33/FR1HK33', FR1HK34/FR1HK34', FR1HK35/FR1HK35', FR1HK36/FR1HK36', FR1HK37/FR1HK37', FR1HK38/FR1HK38', FR1HK39/FR1HK39', FR1HK40/FR1HK40', FR1HK41/FR1HK41', FR1HK42/FR1HK42', FR1HK43/FR1HK43' o FR1HK44/FR1HK44'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 5.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR2 de cadena pesada (según la definición de Kabat) se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 22 y la tabla 23 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

Tabla 22. Cebadores directos de FR2 de cadena pesada (definición de Kabat) (para el sub-banco 6):

788	FR2HK1	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG
789	FR2HK2	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG
790	FR2HK3	TGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTG
791	FR2HK4	TGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTTG
792	FR2HK5	TGGGTGCGACAGGCCCCCGGACAAGCGCTTG
793	FR2HK6	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG
794	FR2HK7	TGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCCTTG
795	FR2HK8	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG
796	FR2HK9	TGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTG
797	FR2HK10	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGG
798	FR2HK11	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGG
799	FR2HK12	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGG
800	FR2HK13	TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
801	FR2HK14	TGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGG
802	FR2HK15	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
803	FR2HK16	TGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGG
804	FR2HK17	TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
805	FR2HK18	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
806	FR2HK19	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
807	FR2HK20	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG
808	FR2HK21	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG
809	FR2HK22	TGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGG
810	FR2HK23	TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG

811	FR2HK24	TGGGTCCGTC AAGCTCCGGGGAAGGGTCTGG
812	FR2HK25	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
813	FR2HK26	TGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
814	FR2HK27	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
815	FR2HK28	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGG
816	FR2HK29	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
817	FR2HK30	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
818	FR2HK31	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
819	FR2HK32	TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGG
820	FR2HK33	TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
821	FR2HK34	TGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGG
522	FR2HK35	TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGG
823	FR2HK36	TGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGG
824	FR2HK37	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGG
825	FR2HK38	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGG
826	FR2HK39	TGGATCCGGCAGCCCCGCCGGAAGGGACTGG
827	FR2HK40	TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGG
828	FR2HK41	TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGG
829	FR2HK42	TGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGG
830	FR2HK43	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTG
831	FR2HK44	TGGGTGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG

Tabla 23. Cebadores inversos de FR2 de cadena pesada (definición de Kabat) (para el sub-banco 6):

832	FR2HK1'	TCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT
833	FR2HK2'	TCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT
834	FR2HK3'	TCCATCCACTCAAGCCCTTTTCCAGGAGCCT
835	FR2HK4'	TCCATCCACTCAAGCCTTTGTCCGGGGGCCT
836	FR2HK5'	TCCATCCACTCAAGCGCTTGTCCGGGGGCCT
837	FR2HK6'	TCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT
838	FR2HK7'	TCCTATCCACTCAAGGCGTTGTCCACGAGCCT
839	FR2HK8'	TCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT
840	FR2HK9'	TCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGTGGCCT
841	FR2HK10'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCT
842	FR2HK11'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTTCCTGGGGGCT
843	FR2HK12'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCT
844	FR2HK13'	TGAAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
845	FR2HK14'	TGAGACCCACTCCAGACCTTTTCTGTAGCTT
846	FR2HK15'	GCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
847	FR2HK16'	CGATACCCACTCCAGCCCCTTTCCTGGAGCCT
848	FR2HK17'	AGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCTT
849	FR2HK18'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
850	FR2HK19'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
851	FR2HK20'	TGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCT

852	FR2HK21'	TGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCT
853	FR2HK22'	CGATACCCACTCCAGCCCCTTTCCTGGAGCCT
854	FR2HK23'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
855	FR2HK24'	AGAGACCCACTCCAGACCCTTCCCCGGAGCCT
856	FR2HK25'	TGAAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
857	FR2HK26'	ACCTACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
858	FR2HK27'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
859	FR2HK28'	TGAAACATATTCCAGTCCCTTCCCTGGAGCCT
860	FR2HK29'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
861	FR2HK30	GGCCACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
862	FR2HK31'	GCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
863	FR2HK32'	GCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCGGAAGCCT
864	FR2HK33'	TGAGACCCACACCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
865	FR2HK34'	TGAGACCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGAGCCT
866	FR2HK35'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT
867	FR2HK36'	CCCAATCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGGTGCT
868	FR2HK37'	CCCAATCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGGGGCT
869	FR2HK38'	CCCAATCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGGGGCT
870	FR2HK39'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCGGCGGGCT
871	FR2HK40'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT
872	FR2HK41'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT
873	FR2HK42'	CCCCATCCACTCCAGGCCCTTCCCGGGCATCT
874	FR2HK43'	TCCAGCCACTCAAGGCCCTCTCGATGGGGACT
875	FR2HK44'	TCCATCCACTCAAGCCCCTTGTCCAGGGGCT

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (44 en total): FR2HK1/FR2HK1', FR2HK2/FR2HK2', FR2HK3/FR2HK3', FR2HK4/FR2HK4', FR2HK5/FR2HK5', FR2HK6/FR2HK6', FR2HK7/FR2HK7', FR2HK8/FR2HK8', FR2HK9/FR2HK9', FR2HK10/FR2HK10', FR2HK11/FR2HK11', FR2HK12/FR2HK12', FR2HK13/FR2HK13', FR2HK14/FR2HK14', FR2HK15/FR2HK15', FR2HK16/FR2HK16', FR2HK17/FR2HK17', FR2HK18/FR2HK18', FR2HK19/FR2HK19', FR2HK20/FR2HK20', FR2HK21/FR2HK21', FR2HK22/FR2HK22', FR2HK23/FR2HK23', FR2HK24/FR2HK24', FR2HK25/FR2HK25', FR2HK26/FR2HK26', FR2HK27/FR2HK27', FR2HK28/FR2HK28', FR2HK29/FR2HK29', FR2HK30/FR2HK30', FR2HK31/FR2HK31', FR2HK32/FR2HK32', FR2HK33/FR2HK33', FR2HK34/FR2HK34', FR2HK35/FR2HK35', FR2HK36/FR2HK36', FR2HK37/FR2HK37', FR2HK38/FR2HK38', FR2HK39/FR2HK39', FR2HK40/FR2HK40', FR2HK41/FR2HK41', FR2HK42/FR2HK42', FR2HK43/FR2HK43' o FR2HK44/FR2HK44'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 6.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR3 de cadena pesada (según la definición de Kabat) se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 24 y la tabla 25 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia)

Tabla 24. Cebadores directos de FR3 de cadena pesada (definición de Kabat) (para el sub-banco 7):

876	FR3HK1	AGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG
877	FR3HK2	AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTG
878	FR3HK3	AGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
879	FR3HK4	AGAGTCACCATGACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
880	FR3HK5	AGAGTCACCATGACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
881	FR3HK6	AGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
882	FR3HK7	AGAGTCACCATGACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCCG

883	FR3HK8	AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
884	FR3HK9	AGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
885	FR3HK10	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTG
886	FR3HK11	AGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTCCTACAATGACCAACATGGACCCTG
887	FR3HK12	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTG
888	FR3HK13	CGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
889	FR3HK14	CGATTCACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
890	FR3HK15	AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
891	FR3HK16	CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACCCCTGTATCTGCAAAGAACAGACGGAGAGCCG
892	FR3HK17	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG
893	FR3HK18	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
894	FR3HK19	CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
895	FR3HK20	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG
396	FR3HK21	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
897	FR3HK22	CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGCAAACGAATAGCCTGAGGGCCG
898	FR3HK23	AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAACCTGAGAGCTG
899	FR3HK24	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTG
900	FR3HK25	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTCCAAATGAACAGCCTGAGAGACG
901	FR3HK26	AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
902	FR3HK27	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
903	FR3HK28	AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGGGCAGCCTGAGAGCTG
904	FR3HK29	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG
905	FR3HK30	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
906	FR3HK31	AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
907	FR3HK32	AGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
908	FR3HK33	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG
909	FR3HK34	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTG
910	FR3HK35	CGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG
911	FR3HK36	CGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCG
912	FR3HK37	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG
913	FR3HK38	CGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG
914	FR3HK39	CGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG
915	FR3HK40	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTG
916	FR3HK41	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTG
917	FR3HK42	CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCT
918	FR3HK43	CGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCG
919	FR3HK44	CGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTG

Tabla 25. Cebadores inversos de FR3 de cadena pesada (definición de Kabat) (para el sub-banco 7):

920	FR3HK1'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTGTCAGATCTCAGGCTCCTCAGCT
921	FR3HK2'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTGTCAGATCTCAGCCTGCTCAGCT
922	FR3HK3'	TGTTGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
923	FR3HK4'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT

ES 2 458 636 T3

924	FR3HK5'	TCTTGCACAGTAATACATGGCTGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
925	FR3HK6'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
926	FR3HK7'	TGCCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGATCTCAGGCTGCTCAGCT
927	FR3HK8'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
928	FR3HK9'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
929	FR3HK10'	CCGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATGG
930	FR3HK11'	GTGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTG
931	FR3HK12'	CCGTGCACAATAATACGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTG
932	FR3HK13'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTT
933	FR3HK14'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTT
934	FR3HK15'	TGTGGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATTT
935	FR3HK16'	TCTCACACAGTAATACACAGCCATGTCTCGGCTCTCCGTCTGTTCTTTTT
936	FR3HK17'	TCTCGCACAGTGATAACAAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTTCATTT
937	FR3HK18'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTT
938	FR3HK19'	TTTTGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTT
939	FR3HK20'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTTCATTT
940	FR3HK21'	CTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTT
941	FR3HK22'	TCTCACACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCCCTCAGGCTATTTCGTTT
942	FR3HK23'	TCTGGCACAGTAATACACGGCCGTGCCCTCAGCTCTCAGGTTGTTTCATTT
943	FR3HK24'	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGTTCTCAGACTGTTTCATTT
944	FR3HK25'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGTCTCTCAGGCTGTTTCATTT
945	FR3HK26'	TCTAGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATTT
946	FR3HK27'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTGTGTCAGGCTGTTTCATTT
947	FR3HK28'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCTCAGCTCTCAGGCTGCCCATTT
948	FR3HK29'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTTCATTT
949	FR3HK30'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCGTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTT
950	FR3HK31'	TCTAGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATTT
951	FR3HK32'	TCTAGTACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATTT
952	FR3HK33'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTTCATTT
953	FR3HK34'	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGACTGTTTCATTT
954	FR3HK35'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCACGGCGGTACACAGAGCTCAGCT
955	FR3HK36'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCAGTCACAGAGCTCAGCT
956	FR3HK37'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCGCGGCGGTACACAGAGCTCAGGT
957	FR3HK38'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCTGCGGCGGTACACAGAGCTCAGCT
958	FR3HK39'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCGGTACACAGAGCTCAGCT
959	FR3HK40'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGAGCGGTACACAGAGCTCAGCT
960	FR3HK41'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGAGCGGTACACAGAGCTCAGCT
961	FR3HK42'	TCTCGCACAGTAATACATGGCGGTGTCCGAGGCCTTCAGGCTGCTCCACT
962	FR3HK43'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGGAGTCACAGAGTTTCAGCT
963	FR3HK44'	TCTCGCACAGTAATACATGGCCATGTCTCAGCCTTTAGGCTGCTGATCT

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (44 en total): FR3HK1/FR3HK1', FR3HK2/FR3HK2', FR3HK3/FR3HK3', FR3HK4/FR3HK4', FR3HK5/FR3HK5', FR3HK6/FR3HK6', FR3HK7/FR3HK7', FR3HK8/FR3HK8', FR3HK9/FR3HK9', FR3HK10/FR3HK10', FR3HK11/FR3HK11',

FR3HK12/FR3HK12', FR3HK13/FR3HK13', FR3HK14/FR3HK14', FR3HK15/FR3HK15', FR3HK16/FR3HK16',
FR3HK17/FR3HK17', FR3HK18/FR3HK18', FR3HK19/FR3HK19', FR3HK20/FR3HK20', FR3HK21/FR3HK21',
FR3HK22/FR3HK22', FR3HK23/FR3HK23', FR3HK24/FR3HK24', FR3HK25/FR3HK25', FR3HK26/FR3HK26',
FR3HK27/FR3HK27', FR3HK28/FR3HK28', FR3HK29/FR3HK29', FR3HK30/FR3HK31', FR3HK32/FR3HK32',
5 FR3HK33/FR3HK33', FR3HK34/FR3HK34', FR3HK35/FR3HK35', FR3HK36/FR3HK36', FR3HK37/FR3HK37',
FR3HK38/FR3HK38', FR3HK39/FR3HK39', FR3HK40/FR3HK40', FR3HK41/FR3HK41', FR3HK42/FR3HK42',
FR3HK43/FR3HK43' o FR3HK44/FR3HK44'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 7.

10 A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR4 de cadena pesada se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 26 y la tabla 27 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

Tabla 26. Cebadores directos de FR4 de cadena pesada (para el sub-banco 11):

964	FR4H1	TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
965	FR4H2	TGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
966	FR4H3	TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
967	FR4H4	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
968	FR4H5	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
969	FR4H6	TGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

15 Tabla 27. Cebadores inversos de FR4 de cadena pesada (para el sub-banco 11):

970	FR4H1'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCA
971	FR4H2'	TGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCCCCA
972	FR4H3'	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGCCCCA
973	FR4H4'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGCCCCA
974	FR4H5'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGCCCCA
975	FR4H6'	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCCCA

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (6 en total): FR4H1/FR4H1',
FR4H2/FR4H2', FR4H3/FR4H3', FR4H4/FR4H4', FR4H5/FR4H5' o FR4H6/FR4H6'. El agrupamiento de los
20 productos de PCR genera el sub-banco 11.

En algunas realizaciones, se construyen sub-bancos de FR de cadena pesada 8, 9, 10 y 11 en los que el sub-banco
8 comprende ácidos nucleicos, cada uno de los cuales codifica para una FR1 de cadena pesada; el sub-banco 9
comprende ácidos nucleicos, cada uno de los cuales codifica para una FR2 de cadena pesada; el sub-banco 10
comprende ácidos nucleicos, cada uno de los cuales codifica para una FR3 de cadena pesada; y el sub-banco 11
25 comprende ácidos nucleicos, cada uno de los cuales codifica para una FR4 de cadena pesada, respectivamente, y
en los que FR1, FR2 y FR3 de cadena pesada se definen según la definición de Chothia para CDR H1 y H2. En
algunas realizaciones, las secuencias de FR se derivan de secuencias de anticuerpos humanos funcionales. En
otras realizaciones, las secuencias de FR se derivan de secuencias de cadena pesada de línea germinal humana.

30 A modo de ejemplo pero no de limitación, lo siguiente describe un método de generación de 4 sub-bancos de FR de
cadena pesada usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que se usan secuencias de cadena
pesada de línea germinal humana como moldes. Los Sub-bancos de FR de cadena pesada 7, 8 y 9 (que codifican
para FR1, 2, 3, respectivamente) abarcan 44 secuencias de cadena pesada de línea germinal humana (VH1-18,
VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-
35 VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-
64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61,
VH5-51, VH6-1 y VH7-81). Véase Matsuda *et al.*, 1998, J. Exp. Med., 188:1973-1975. Las secuencias se resumen
en el sitio web del NCBI: [www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chain-
Type=VH&seqType=nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chain-Type=VH&seqType=nucleotide). El sub-banco 11 (codifica para FR4) es el mismo sub-banco 11 tal como se
40 describió anteriormente.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR1 de cadena pesada (según la
definición de Chothia) se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por
solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 28 y la tabla 29 (mostrados todos en la orientación
de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):
45

Tabla 28. Cebadores directos de FR1 de cadena pesada (definición de Chothia) (para el sub-banco 8):

ES 2 458 636 T3

976	FR1HC1	CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
977	FR1HC2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
978	FR1HC3	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
979	FR1HC4	CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
980	FR1HC5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCTCTCA
981	FR1HC6	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
982	FR1HC7	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCA
983	FR1HC8	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCTCG
984	FR1HC9	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
985	FR1HC10	CAGGTCACCTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTAAAACCCACAGAGACC
986	FR1HC11	CAGATCACCTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTAAAACCCACACAGACC
987	FR1HC12	CAGGTCACCTGAGGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTAAAACCCACACAGACC
988	FR1HC13	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCC
989	FR1HC14	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
990	FR1HC15	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCC
991	FR1HC16	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
992	FR1HC17	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
993	FR1HC18	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGGGGGTCC
994	FR1HC19	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
995	FR1HC20	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
996	FR1HC21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
997	FR1HC22	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCC
998	FR1HC23	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCC
999	FR1HC24	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
1000	FR1HC25	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
1001	FR1HC26	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCC
1002	FR1HC27	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
1003	FR1HC28	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
1004	FR1HC29	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
1005	FR1HC30	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
1006	FR1HC31	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCC
1007	FR1HC32	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
1008	FR1HC33	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCC
1009	FR1HC34	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCC
1010	FR1HC35	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACC
1011	FR1HC36	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACC
1012	FR1HC37	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACC
1013	FR1HC38	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
1014	FR1HC39	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
1015	FR1HC40	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
1016	FR1HC41	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
1017	FR1HC42	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCT

ES 2 458 636 T3

1018	FR1HC43	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACC
1019	FR1HC44	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCA

Tabla 29. Cebadores inversos de FR1 de cadena pesada (definición de Chothia) (para el sub-banco 8):

1020	FR1HC1'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1021	FR1HC2'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1022	FR1HC3'	GGAAACCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1023	FR1HC4'	AGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1024	FR1HC5'	GGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGACCCAGTCTTCTTCAC
1025	FR1HC6'	AGATGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1026	FR1HC7'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGTCCCAGGCTTCTTCAC
1027	FR1HC8'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGTCCCAGGCTTCTTCAC
1028	FR1HC9'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1039	FR1HC10'	AGAGACGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTCTGTGGGTTTACCAG
1030	FR1HC11'	AGAGAAGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTGTGTGGGTTTACCAG
1031	FR1HC12'	AGAGAAGGTGCAGGTCAGTGAGGGTCTGTGTGGGTTTACCAG
1032	FR1HC13'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCTCCAGGCTTGACCAA
1033	FR1HC14'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1034	FR1HC15'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTAAGGGACCCCCCAGGCTTTACCAA
1035	FR1HC16'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1036	FR1HC17'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCCGTACCA
1037	FR1HC18'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTTGACCA
1038	FR1HC19'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1039	FR1HC20'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCCAGGCTGGACCAC
1040	FR1HC21'	AGACGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCCAGGCTGGACCAC
1041	FR1HC22'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGATCCCCCAGGCTGTACCAA
1042	FR1HC23'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCTAGGCTGTACCAA
1043	FR1HC24'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAC
1044	FR1HC25'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1045	FR1HC26'	AGAAGCTGTACAGGAGAGTCTCAGGGACCGCCCTGGCTGTACCAA
1046	FR1HC27'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGATCAA
1047	FR1HC28'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1048	FR1HC29'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGATCAA
1049	FR1HC30'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1050	FR1HC31'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGCTGGACCAA
1051	FR1HC32'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTTTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1052	FR1HC33'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGAACTAA
1053	FR1HC34'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTGCCAGGCTGTACCAA
1054	FR1HC35'	AGAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTGTCCGAAGGCTTACCAG
1055	FR1HC36'	AGAGACAGTACAGGTGAGGGACAGGGTCTGTGAAGGCTTACCAG
1056	FR1HC37'	ATAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCAACAG
1057	FR1HC38'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTACCAG
1058	FR1HC39'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTACCAG

1059	FR1HC40'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1060	FR21C41'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1061	FR1HC42'	AGAACCCTTACAGGAGATCTTCAGAGACTCCCCGGGCTTTTTTCAC
1062	FR1HC43'	GGAGATGGCACAGGTGAGTGAGAGGGTCTGCGAGGGCTTCACCAG
1063	FR1HC44'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTGCTTCAC

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (44 en total): FR1HC1/FR1HC1', FR1HC2/FR1HC2', FR1HC3/FR1HC3', FR1HC4/FR1HC4', FR1HC5/FR1HC5', FR1HC6/FR1HC6', FR1HC7/FR1HC7', FR1HC8/FR1HC8', FR1HC9/FR1HC9', FR1HC10/FR1HC10', FR1HC11/FR1HC11', FR1HC12/FR1HC12', FR1HC13/FR1HC13', FR1HC14/FR1HC14', FR1HC15/FR1HC15', FR1HC16/FR1HC16', FR1HC17/FR1HC17', FR1HC18/FR1HC18', FR1HC19/FR1HC19', FR1HC20/FR1HC20', FR1HC21/FR1HC21', FR1HC22/FR1HC22', FR1HC23/FR1HC23', FR1HC24/FR1HC24', FR1HC25/FR1HC25', FR1HC26/FR1HC26', FR1HC27/FR1HC27', FR1HC28/FR1HC28', FR1HC29/FR1HC29', FR1HC30/FR1HC30', FR1HC31/FR1HC31', FR1HC32/FR1HC32', FR1HC33/FR1HC33', FR1HC34/FR1HC34', FR1HC35/FR1HC35', FR1HC36/FR1HC36', FR1HC37/FR1HC37', FR1HC38/FR1HC38', FR1HC39/FR1HC39', FR1HC40/FR1HC40', FR1HC41/FR1HC41', FR1HC42/FR1HC42', FR1HC43/FR1HC43' o FR1HC44/FR1HC44'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 8.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR2 de cadena pesada (según la definición de Chothia) se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 30 y la tabla 31 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

Tabla 30. Cebadores directos de FR2 de cadena pesada (definición de Chothia) (para el sub-banco 9):

1064	FR2HC1	TATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT
1065	FR2HC2	TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT
1066	FR3HC3	TTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTT
1067	FR2HC4	TATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGGGCTT
1068	FR2HC5	CGCTACCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCGGACAAGCGCTT
1069	FR2HC6	TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT
1070	FR2HC7	TCTGCTATGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTT
1071	FR2HC8	TATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT
1072	FR2HC9	TATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTT
1073	FR2HC10	ATGGGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTG
1074	FR2HC11	GTGGGTGTGGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTG
1075	FR2HC12	ATGTGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTG
1076	FR2HC13	TACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1077	FR2HC14	TACGACATGCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTG
1078	FR2HC15	GCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGGTG
1079	FR2HC16	AGTGACATGAACTGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTG
1080	FR2HC17	TATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1081	FR2HC18	TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1082	FR2HC19	TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1083	FR2HC20	TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
1084	FR2HC21	TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
1085	FR2HC22	AGTGACATGAACTGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTG
1086	FR2HC23	AATGAGATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1087	FR2HC24	TATACCATGCACTGGGTCCGTCAGCTCCGGGGAAGGGTCTG
1088	FR2HC25	TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG

ES 2 458 636 T3

1089	FR2HC26	TATGCTATGAGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1090	FR2HC27	AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1091	FR2HC28	TATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTG
1092	FR2HC29	AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1093	FR2HC30	TATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1094	FR2HC31	CACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1095	FR2HC32	TCTGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTG
1096	FR2HC33	TACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1097	FR2HC34	TATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTG
1098	FR2HC35	AACTGGTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTG
1099	FR2HC36	TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
1100	FR2HC37	TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTG
1101	FR2HC38	TACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTG
1102	FR2HC39	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTG
1103	FR2HC40	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTG
1104	FR2HC41	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTG
1105	FR2HC42	TACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTG
1106	FR2HC43	GCTGCTTGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTT
1107	FR2HC44	TATGGTATGAATTGGGTGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTT

Tabla 31. Cebadores inversos de FR2 de cadena pesada (definición de Chothia) (para el sub-banco 9):

1108	FR2HC1'	GATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGCCAGGGGCCTG
1109	FR2HC2'	GATCCATCCCATCCAGTCAAGCCCTTGCCAGGGGCCTG
1110	FR2HC3'	AAAACCTCCCATCCACTCAAGCCCTTTTCCAGGAGCCTG
1111	FR2HC4'	GCTCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGCCAGGGGCCTG
1112	FR2HC5'	GATCCATCCCATCCACTCAAGCGCTTGCCAGGGGCCTG
1113	FR2HC6'	GATTATTCCCATCCACTCAAGCCCTTGCCAGGGGCCTG
1114	FR2HC7'	GATCCATCCTATCCACTCAAGGCGTTGCCACGAGCCTG
1115	FR2HC8'	GATCCCTCCCATCCACTCAAGCCCTTGCCAGGGGCCTG
1116	FR2HC9'	CATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGCCAGTGGCCTG
1117	FR2HC10'	AATGTGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCTG
1118	FR3HC11'	AATGAGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCTG
1119	FR2HC12'	AATGAGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCTG
1130	FR2HC13'	AATGTATGAAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1121	FR2HC14'	AATAGCTGAGACCCACTCCAGACCTTTTCCCTGTAGCTTG
1122	FR2HC15'	AATACGGCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1123	FR2HC16'	AACACCCGATAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTT
1134	FR2HC17'	AATACCAGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1125	FR2HC18'	AATGGATGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1126	FR2HC19'	AATAGCTGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1127	FR2HC20'	TATAACTGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCTG
1128	FR2HC21'	TATAACTGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCTG
1129	FR2HC22'	AACACCCGATAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG

1130	FR2HC23'	AATGGATGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1131	FR2HC24'	ATAAGAGAGACCCACTCCAGACCCTTCCCGGAGCTTG
1132	FR2HC25'	AATGTATGAAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1133	FR2HC26'	AATGAAACCTACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1134	FR2HC27'	AATAACTGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1135	FR2HC28'	AATAGCTGAAACATATTCCAGTCCCTTCCCTGGAGCCTG
1136	FR2HC29'	AATAACTGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1137	FR2HC30'	TATGTTGGCCACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1138	FR2HC31'	AGTACGGCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1139	FR2HC32'	AATACGGCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCGGAAGCCTG
1140	FR2HC33'	AATACGTGAGACCCACACCAGCCCCTTCCCTGGAGCTTG
1141	FR2HC34'	AATACCTGAGACCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGAGCTTG
1142	FR2HC35'	GATGTACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG
1143	FR2HC36'	GATGTACCCAATCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGGTGCTG
1144	FR2HC37'	GATTTCCCAATCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGGGGCTG
1145	FR2HC38'	GATACTCCAATCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGGGGCTG
1146	FR2HC39'	GATACGCCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCGGGGGCTG
1147	FR2HC40'	GATATACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG
1148	FR2HC41'	GATATACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG
1149	FR2HC42'	GATGATCCCATCCACTCCAGGCCCTTCCCGGGCATCTG
1150	FR2HC43'	TGTCCTTCCCAGCCACTCAAGGCCTCTCGATGGGGACTG
1151	FR2HC44'	GAACCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGCCAGGGGCCTG

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (44 en total): FR2HC1/FR2HC1', FR2HC2/FR2HC2', FR2HC3/FR2HC3', FR2HC4/FR2HC4', FR2HC5/FR2HC5', FR2HC6/FR2HC6', FR2HC7/FR2HC7', FR2HC8/FR2HC8', FR2HC9/FR2HC9', FR2HC10/FR2HC10', FR2HC11/FR2HC11', FR2HC12/FR2HC12', FR2HC13/FR2HC13', FR2HC14/FR2HC14', FR2HC15/FR2HC15', FR2HC16/FR2HC16', FR2HC17/FR2HC17', FR2HC18/FR2HC18', FR2HC19/FR2HC19', FR2HC20/FR2HC20', FR2HC21/FR2HC21', FR2HC22/FR2HC22', FR2HC23/FR2HC23', FR2HC24/FR2HC24', FR2HC25/FR2HC25', FR2HC26/FR2HC26', FR2HC27/FR2HC27', FR2HC28/FR2HC28', FR2HC29/FR2HC29', FR2HC30/FR2HC30', FR2HC31/FR2HC31', FR2HC32/FR2HC32', FR2HC33/FR2HC33', FR2HC34/FR2HC34', FR2HC35/FR2HC35', FR2HC36/FR2HC36', FR2HC37/FR2HC37', FR2HC38/FR2HC38', FR2HC39/FR2HC39', FR2HC40/FR2HC40', FR2HC41/FR2HC41', FR2HC42/FR2HC42', FR2HC43/FR2HC43' o FR2HC44/FR2HC44'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 9.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la construcción del sub-banco de FR3 de cadena pesada (según la definición de Chothia) se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 32 y la tabla 33 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

Tabla 32. Cebadores directos de FR3 de cadena pesada (definición de Chothia) (para el sub-banco 10):

	FR3HC1
1152	ACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGG
	FR3HC2
1153	ACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGG
	FR3HC3
1154	ACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGG

ES 2 458 636 T3

1155 FR3HC4
ACAAAATATTCACAGGAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGG

1156 FR3HC5
ACCAACTACGCACAGAAATTCAGGACAGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGG

1157 FR3HC6
ACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGG

1158 FR3HC7
ACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGG

1159 FR3HC8
GCAA ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG

1160 FR3HC9
ACAGGCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGG

1161 FR3HC10
AAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTA

1162 FR3HC11
AAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTCCTTA

1163 FR3HC12
AAATACTACAGCACATCTCTGAAGACCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTCCTTA

1164 FR3HC13
ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGA ACTCACTGTATCTGC

1165 FR3HC14
ACATACTATCCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGA ACTCCTTGATCTTC

1166 FR3HC15
ACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAACACGCTGTATCTGC

1167 FR3HC16
ACGCACTATGTGGACTCCGTGAAGCGCCGATTATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGA ACTCCCTGTATCTGC

1168 FR3HC17
ACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCCCTGTATCTGC

1169 FR3HC18
ATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCACCAAGAGACAACGCCAAGA ACTCACTGTATCTGC

1170 FR3HC19
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGC

1171 FR3HC20
AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGC

1172 FR3HC21
AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGC

ES 2 458 636 T3

1173 FR3HC22
ACGCACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGC

1174 FR3HC23
ACATACTACGCAGACTCCAGGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC

1175 FR3HC24
ACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCCCTGTATCTGC

1176 FR3HC25
ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGC

1177 FR3HC26
ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGC

1178 FR3HC27
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC

1179 FR3HC28
ACATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC

1180 FR3HC29
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC

1181 FR3HC30
AAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC

1182 FR3HC31
ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGC

1183 FR3HC32
ACAGCATATGCTGCGTCCGTGAAAGGCAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGC

1184 FR3HC33
ACAAGCTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGC

1185 FR3HC34
ATAGGCTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGC

1186 FR3HC35
ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA

1187 FR3HC36
ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGA

1188 FR3HC37
ACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA

1189 FR3HC38
ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA

1190 FR3HC39
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA

ES 2 458 636 T3

	FR3HC40
1191	ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
	FR3HC41
1192	ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
	FR3HC42
1193	ACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGC
	FR3HC43
1194	AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC
	FR3HC44
1195	CCAACATATGCCAGGGCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACTGC

Tabla 33. Cebadores inversos de FR3 de cadena pesada (definición de Chothia) (para el sub-banco 10):

	FR3HC1'
1196	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGGCTCCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGTGG
	FR3HC2'
1197	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGCCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTGATGG
	FR3HC3'
1198	TGTTGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGTCTGTAG
	FR3HC4'
1199	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGCGG
	FR3HC5'
1200	TCTrGCACAGTAATACATGGCTGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCATAG
	FR3HC6'
1201	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTOTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCACCTCCATGTAGACfGTGCTCGTGG
	FR3HC7'
1202	TGCCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTTGTGG
	FR3HC8'
1203	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGTGG
	FR3HC9'
1204	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTTATGG
	FR3HC10'
1205	CCGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTGTAAGGACCACCTGGCTTTTGG
	FR3HC11'
1206	GTGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTGTAAGGACCACCTGGTTTTTGG
	FR3HC12'
1207	CCGTGCACAATAATACGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTGTAAGGACCACCTGGTTTTTGG
	FR3HC13'
1208	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTGCAGATACAGTGAGTTCTTGG

ES 2 458 636 T3

	FR3HC14'
1209	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGAAGATACAAGGAGTTCTTGG
	FR3HC15'
1210	TGTGGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGCGTGTTTTTTG
	FR3HC16'
1211	TCTCACACAGTAATACACAGCCATGTCCCTCGGCTCTCCGTCTGTTCTTTTGCAGATACAGGGAGTTCCTGG
	FR3HC17'
1212	TCTCGCACAGTGATACAAGGCCGTGTCCCTCGGCTCTCAGACTGTTCAATTTGCAGATACAGGGAGTTCCTTGG
	FR3HC18'
1213	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGTGAGTTCCTTGG
	FR3HC19'
1214	TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGCGTGTTCCTTGG
	FR3HC20'
1215	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCAGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGCGTGTTCCTTGG
	FR3HC21'
1216	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGCGTGTTCCTTGG
	FR3HC22'
1217	TCTCACACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCGGCCCTCAGGCTATTCGTTTGCAGATACAGGGTGTTCCTGG
	FR3HC23'
1218	TCTGGCACAGTAATACACCGCCGTGCCCTCAGCTCTCAGGTTGTTCAATTTGAAGATACAGCCTGTTCTTGG
	FR3HC24'
1219	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCCTCAGTTCTCAGACTGTTCAATTTGCAGATACAGGGAGTTTTTGC
	FR3HC25'
1220	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCGTCTCTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGTGAGTTCCTTGG
	FR3HC26'
1221	TCTAGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATAGGCGATGCTTTTGG
	FR3HC27'
1222	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGAAGATACAGCGTGTTCCTTGG
	FR3HC28'
1223	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCCTCAGCTCTCAGGCTGCCCATTTGAAGATACAGCGTGTTCCTTGG
	FR3HC29'
1224	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCAGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGAAGATACAGCGTGTTCCTTGG
	FR3HC30'
1225	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGTGAGTTCCTTGG
	FR3HC31'
1226	TCTAGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGTGAGTTCCTTGG

	FR3HC32'
1227	TCTAGTACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACGCCGTGTTCTTTG
	FR3HC33'
1228	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCGGCTCTCAGACTGTTCAATTTGCAGATACAGCGTGTTCTTGG
	FR3HC34'
1229	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGACTGTTCAATTTGCAGATACAGGGAGTTCTTGG
	FR3HC35'
1230	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCACGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
	FR3HC36'
1231	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCCGGCGCAGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTAG
	FR3HC37'
1232	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
	FR3HC38'
1233	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCTGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
	FR3HC39'
1234	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
	FR3HC40'
1233	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGAGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
	FR3HC41'
1236	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGAGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
	FR3HC42'
1237	TCTCGCACAGTAATACATGGCGGTGTCCGAGGCCTTCAGGCTGCTCCACTGCAGGTAGGCGGTGCTGATGG
	FR3HC43'
1238	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCTCGGGAGTCACAGAGTTCACTGCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
	FR3HC44'
1239	TCTCGCACAGTAATACATGGCCATGTCTCAGCCTTTAGGCTGCTGATCTGCAGGTATGCTGTGCTGGCAG

La PCR se lleva a cabo usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (44 en total): FR3HC1/FR3HC1', FR3HC2/FR3HC2', FR3HC3/FR3HC3', FR3HC4/FR3HC4', FR3HC5/FR3HC5', FR3HC6/FR3HC6', FR3HC7/FR3HC7', FR3HC8/FR3HC8', FR3HC9/FR3HC9', FR3HC10/FR3HC10', FR3HC11/FR3HC11', FR3HC12/FR3HC12', FR3HC13/FR3HC13', FR3HC14/FR3HC14', FR3HC15/FR3HC15', FR3HC16/FR3HC16', FR3HC17/FR3HC17', FR3HC18/FR3HC18', FR3HC19/FR3HC19', FR3HC20/FR3HC20', FR3HC21/FR3HC21', FR3HC22/FR3HC22', FR3HC23/FR3HC23', FR3HC24/FR3HC24', FR3HC25/FR3HC25', FR3HC26/FR3HC26', FR3HC27/FR3HC27', FR3HC28/FR3HC28', FR3HC29/FR3HC29', FR3HC30/FR3HC30', FR3HC31/FR3HC31', FR3HC32/FR3HC32', FR3HC33/FR3HC33', FR3HC34/FR3HC34', FR3HC35/FR3HC35', FR3HC36/FR3HC36', FR3HC37/FR3HC37', FR3HC38/FR3HC38', FR3HC39/FR3HC39', FR3HC40/FR3HC40', FR3HC41/FR3HC41', FR3HC42/FR3HC42', FR3HC43/FR3HC43' o FR3HC44/FR3HC44'. El agrupamiento de los productos de PCR genera el sub-banco 10.

2.3 Selección de CDR

Además de la síntesis de sub-bancos de regiones de entramado, pueden generarse sub-bancos de CDR y fusionarse al azar en marco con regiones de entramado de sub-bancos de regiones de entramado para producir bibliotecas combinatorias de anticuerpos (con o sin regiones constantes) que pueden examinarse para determinar su inmunoespecificidad para un antígeno de interés, así como su inmunogenicidad en un organismo de interés. La metodología de biblioteca combinatoria de la invención se muestra a modo de ejemplo en el presente documento

para la producción de anticuerpos humanizados para su uso en seres humanos. Sin embargo, la metodología de biblioteca combinatoria puede aplicarse fácilmente a la producción de anticuerpos para su uso en cualquier organismo de interés.

5 La presente invención proporciona un sub-banco de CDR para cada CDR de la cadena ligera variable y la cadena pesada variable. Por consiguiente, la invención proporciona un sub-banco de regiones CDR para CDR1 de cadena ligera variable, CDR2 de cadena ligera variable y CDR3 de cadena ligera variable para cada especie de interés y para cada definición de una CDR (por ejemplo, Kabat y Chothia). La invención también proporciona un sub-banco de CDR para CDR1 de cadena pesada variable, CDR2 de cadena pesada variable y CDR3 de cadena pesada variable para cada especie de interés y para cada definición de una CDR (por ejemplo, Kabat y Chothia). Los sub-bancos de CDR pueden comprender CDR que se han identificado como parte de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés. Los sub-bancos de CDR pueden usarse fácilmente para sintetizar una biblioteca combinatoria de anticuerpos que puede examinarse para determinar su inmunoespecificidad para un antígeno de interés, así como su inmunogenicidad en un organismo de interés.

15 Por ejemplo, pueden construirse sub-bancos de CDR de cadena ligera 12, 13 y 14, en los que el sub-banco de CDR 12 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR1 de cadena ligera según el sistema de Kabat; el sub-banco de CDR 13 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR2 de cadena ligera según el sistema de Kabat; y el sub-banco de CDR 14 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR3 de cadena ligera según el sistema de Kabat. Pueden construirse sub-bancos de CDR de cadena ligera 15, 16 y 17, en los que el sub-banco de CDR 15 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR1 de cadena ligera según el sistema de Chothia; el sub-banco de CDR 16 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR2 de cadena ligera según el sistema de Chothia; y el sub-banco de CDR 17 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR3 de cadena ligera según el sistema de Chothia.

30 Pueden construirse sub-bancos de CDR de cadena pesada 18, 19 y 20, en los que el sub-banco de CDR 18 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR1 de cadena pesada según el sistema de Kabat; el sub-banco de CDR 19 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR2 de cadena pesada según el sistema de Kabat; y el sub-banco de CDR 20 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR3 de cadena pesada según el sistema de Kabat. Pueden construirse sub-bancos de CDR de cadena pesada 21, 22 y 23, en los que el sub-banco de CDR 21 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR1 de cadena pesada según el sistema de Chothia; el sub-banco de CDR 22 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR2 de cadena pesada según el sistema de Chothia; y el sub-banco de CDR 23 comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para CDR3 de cadena pesada según el sistema de Chothia.

45 En algunas realizaciones, las secuencias de CDR se derivan de secuencias de anticuerpos funcionales. En algunas realizaciones, las secuencias de CDR son secuencias al azar, que comprenden al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 secuencias de nucleótidos contiguas, sintetizadas mediante cualquier método conocido en la técnica. Los sub-bancos de CDR pueden usarse para la construcción de sub-bibliotecas combinatorias. Alternativamente, puede seleccionarse una CDR de interés particular y después usarse para la construcción de sub-bibliotecas combinatorias (véase la sección 5.3).

2.4 Construcción de sub-bibliotecas combinatorias

55 Se construyen sub-bibliotecas combinatorias fusionando en marco CDR no humanas con regiones de entramado humanas correspondientes de los sub-bancos de FR. Por ejemplo, la sub-biblioteca combinatoria 1 se construye fusionando en marco CDR no humanas con regiones de entramado humanas de cadena ligera kappa correspondientes usando los sub-bancos 1; la sub-biblioteca combinatoria 2 se construye fusionando en marco CDR no humanas con regiones de entramado humanas de cadena ligera kappa correspondientes usando los sub-bancos 2; la sub-biblioteca combinatoria 3 se construye fusionando en marco CDR no humanas con regiones de entramado humanas de cadena ligera kappa correspondientes usando los sub-bancos 3; la sub-biblioteca combinatoria 4 se construye fusionando en marco CDR no humanas con regiones de entramado humanas de cadena ligera kappa correspondientes usando los sub-bancos 4; las sub-bibliotecas combinatorias 5, 6, y 7 se construyen fusionando en marco CDR no humanas (definición de Kabat para CDR H1 y H2) con las regiones de entramado humanas de cadena pesada correspondientes usando los sub-bancos 5, 6 y 7, respectivamente; las sub-bibliotecas combinatorias 8, 9 y 10 se construyen fusionando en marco CDR no humanas (definición de Chothia para CDR H1 y

H2) con las regiones de entramado humanas de cadena pesada correspondientes usando los sub-bancos 8, 9 y 10, respectivamente; las sub-biblioteca combinatoria 11 se construye fusionando en marco CDR H3 no humana (definición de Kabat y de Chothia) con las regiones de entramado de cadena pesada humanas correspondientes usando el sub-banco 11. En algunas realizaciones, las CDR no humanas también pueden seleccionarse de una biblioteca de CDR.

La construcción de sub-bibliotecas combinatorias puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la técnica. A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 1 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 34 y la tabla 35 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

Tabla 34. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR1 de cadena ligera (para la sub-biblioteca 1)

1240	AL1	GATGTTGTGATGACWCAGTCT
1241	AL2	GACATCCAGATGAYCCAGTCT
1242	AL3	GCCATCCAGWTGACCCAGTCT
1243	AL4	GAAATAGTGATGAYGCAGTCT
1244	AL5	GAAATTGTGTTGACRCAGTCT
1245	AL6	GAKATTGTGATGACCCAGACT
1246	AL7	GAAATTGTRMTGACWCAGTCT
1247	AL8	GAYATYGTGATGACYCAGTCT
1248	AL9	GAAACGACACTCACGCAGTCT
1249	AL10	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
1250	AL11	AACATCCAGATGACCCAGTCT
1251	AL12	GCCATCCGGATGACCCAGTCT
1252	AL13	GTCATCTGGATGACCCAGTCT

Tabla 35. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR1 de cadena ligera (para la sub-biblioteca 1)

1253	AL1'	[70% inicial de CDR L1]-GCAGGAGATGGAGGCCGGCTS
1254	AL2'	[70% inicial de CDR L1]-GCAGGAGAGGGTGRCTCTTTC
1255	AL3'	[70% inicial de CDR L1]-ACAASTGATGGTGA CTCTGTC
1356	AL4'	[70% inicial de CDR L1]-GAAGGAGATGGAGGCCGGCTG
1357	AL5'	[70% inicial de CDR L1]-GCAGGAGATGGAGGCCTGCTC
1258	AL6'	[70% inicial de CDR L1]-GCAGGAGATGTTGACTTTGTC
1259	AL7'	[70% inicial de CDR L1]-GCAGGTGATGGTGA CTTTCTC
1360	AL8'	[70% inicial de CDR L1]-GCAGTTGATGGTGGCCCTCTC
1261	AL9'	[70% inicial de CDR L1]-GCAAGTGATGGTGA CTCTGTC
1262	AL10'	[70% inicial de CDR L1]-GCAAATGATACTGA CTCTGTC

La PCR se lleva a cabo con de AL1 a AL13 en combinación con de AL1' a AL10' usando el sub-banco 1 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 1 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 1.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 2 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 36 y la tabla 37 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

Tabla 36. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR2 de cadena ligera (para la sub-biblioteca 2):

1263	BL1	[70% final de CDR L1]-TGGYTTTCAGCAGAGGCCAGGC
1264	BL2	[70% final de CDR L1]-TGGTACCTGCAGAAGCCAGGS

1265	BL3	[70% final de CDR L1]-TGGTATCRGCAGAAACCAGGG
1266	BL4	[70% final de CDR L1]-TGGTACCARCAGAAACCAGGA
1267	BL5	[70% final de CDR L1]-TGGTACCARCAGAAACCTGGC
1268	BL6	[70% final de CDR L1]-TGGTAYCWGCAGAAACCWGGG
1269	BL7	[70% final de CDR L1]-TGGTATCAGCARAAACCWGGS
1270	BL8	[70% final de CDR L1]-TGGTAYCAGCARAAACCAG
1271	BL9	[70% final de CDR L1]-TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGG
1272	BL10	[70% final de CDR L1]-TGGTTTCAGCAGAAACCAGGG

Tabla 37. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR2 de cadena ligera (para la sub-biblioteca 2)

1273	BL1'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGATCAGGAGCTGTGGAGR
1274	BL2'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGATCAGGAGCTTAGGRGC
1275	BL3'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGATGAGGAGCCTGGGMGC
1276	BL4'	[70% inicial de CDR L2]-RTAGATCAGGMGCTTAGGGGC
1277	BL5'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGATCAGGWGCTTAGGRAC
1278	BL6'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGATGAAGAGCTTAGGGGC
1279	BL7'	[70% inicial de CDR L2]-ATAAATTAGGAGTCTTGAGG
1280	BL8'	[70% inicial de CDR L2]-GTAAATGAGCAGCTTAGGAGG
1281	BL9'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGATCAGGAGTGTGGAGAC
1281	BL10'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGATCAGGAGCTCAGGGGC
1283	BL11'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGATCAGGGACTTAGGGGC
1284	BL12'	[70% inicial de CDR L2]-ATAGAGGAAGAGCTTAGGGGA
1285	BL13'	[70% inicial de CDR L2]-CTTGATGAGGAGCTTTGGAGA
1286	BL14'	[70% inicial de CDR L2]-ATAAATTAGGCGCCTTGAGAGA
1287	BL15'	[70% inicial de CDR L2]-CTTGATGAGGAGCTTTGGGGC
1288	BL16'	[70% inicial de CDR L2]-TTGAATAATGAAAATAGCAGC

5 La PCR se lleva a cabo con de BL1 a BL10 en combinación con de BL1' a BL16' usando el sub-banco 2 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 2 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 2.

10 A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 3 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 38 y la tabla 39 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

Tabla 38. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR3 de cadena ligera (para la sub-biblioteca 3):

1289	CL1	[70% final de CDR L2]-GGGGTCCCAGACAGATTTCAGY
1290	CL2	[70% final de CDR L2]-GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGY
1291	CL3	[70% final de CDR L2]-GGYATCCCAGCCAGGTTTCAGT
1292	CL4	[70% final de CDR L2]-GGRGTCCCWGACAGGTTTCAGT
1293	CL5	[70% final de CDR L2]-AGCATCCCAGCCAGGTTTCAGT
1294	CL6	[70% final de CDR L2]-GGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGT
1295	CL7	[70% final de CDR L2]-GGAATCCCACCTCGATTTCAGT
1296	CL8	[70% final de CDR L2]-GGGGTCCCTGACCGATTTCAGT
1297	CL9	[70% final de CDR L2]-GGCATCCCAGACAGGTTTCAGT
1298	CL10	[70% final de CDR L2]-GGGGTCTCATCGAGGTTTCAGT

1299	CL11	[70% final de CDR L2]-GGAGTCCCAGATAGGTTTCAGT
------	------	--

Tabla 39. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR3 de cadena ligera (para la sub-biblioteca 3)

1300	CL1'	[70% inicial de CDR L3]-KCAGTAATAAACCCCAACATC
1301	CL2'	[70% inicial de CDR L3]-ACAGTAATAYGTTGCAGCATC
1302	CL3'	[70% inicial de CDR L3]-ACMGTAATAAGTTGCAACATC
1303	CL4'	[70% inicial de CDR L3]-RCAGTAATAAGTTGCAAAATC
1304	CL5'	[70% inicial de CDR L3]-ACAGTAATAARCTGCAAAATC
1305	CL6'	[70% inicial de CDR L3]-ACARTAGTAAGTTGCAAAATC
1306	CL7'	[70% inicial de CDR L3]-GCAGTAATAAACTCCAAMATC
1307	CL8'	[70% inicial de CDR L3]-GCAGTAATAAACCCCGACATC
1308	CL9'	[70% inicial de CDR L3]-ACAGAAGTAATATGCAGCATC
1309	CL10'	[70% inicial de CDR L3]-ACAGTAATATGTTGCAATATC
1310	CL11'	[70% inicial de CDR L3]-ACAGTAATACACTGCAAAATC
1311	CL12'	[70% inicial de CDR L3]-ACAGTAATAAACTGCCACATC

5 La PCR se lleva a cabo con de CL1 a CL11 en combinación con de CL1' a CL12' usando el sub-banco 3 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 3 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 3.

10 A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 4 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 40 y la tabla 41 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

Tabla 40. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR4 de cadena ligera (para la sub-biblioteca 4):

1312	DL1	[70% final de CDR L3]-TTYGGCCARGGGACCAAGSTG
1313	DL2	[70% final de CDR L3]-TTCGGCCAAGGGACACGACTG
1314	DL3	[70% final de CDR L3]-TTCGGCCCTGGGACCAAGTG
1315	DL4	[70% final de CDR L3]-TTCGGCGGAGGGACCAAGGTG

15 Tabla 41. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR4 de cadena ligera (para la sub-biblioteca 4)

1316	DL1'	TTCGATYTCCACCTTGGTCCC
1317	DL2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
1318	DL3'	TTTGATATCCACTTTGGTCCC
1319	DL4'	TTAATCTCCAGTCGTGTCCC

20 La PCR se lleva a cabo con de DL1 a DL4 en combinación con de DL1' a DL4' usando el sub-banco 4 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 4 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 4.

25 A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 5 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 42 y la tabla 43 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

Tabla 42. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR1 de cadena pesada (definición de Kabat) (para la sub-biblioteca 5):

1320	AH1	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT
1321	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1322	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCT
1323	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT

1324	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1325	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1326	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1327	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1328	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1329	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

Tabla 43. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR1 de cadena pesada (definición de Kabat) (para la sub-biblioteca 5):

1330	AHK1'	[70% inicial de CDR H1]-RGTGAAGGTGTATCCAGAAGC
1331	AHK2'	[70% inicial de CDR H1]-GCTGAGTGAGAACCCAGAGAM
1332	AHK3'	[70% inicial de CDR H1]-ACTGAARGTGAATCCAGAGGC
1333	AHK4'	[70% inicial de CDR H1]-ACTGACGGTGAAYCCAGAGGC
1334	AHK5'	[70% inicial de CDR H1]-GGTGAYGGAGCCACCAGAGAC
1335	AHK6'	[70% inicial de CDR H1]-RGTAAAGGTGWAWCCAGAAGC
1336	AHK7'	[70% inicial de CDR H1]-ACTRAAGGTGAAYCCAGAGGC
1337	AHK8'	[70% inicial de CDR H1]-GGTRAARCTGTAWCCAGAASC
1338	AHK9'	[70% inicial de CDR H1]-AYCAAAGGTGAATCCAGARGC
1339	AHK10'	[70% inicial de CDR H1]-RCTRAAGGTGAATCCAGASGC
1340	AHK12	[70% inicial de CDR H1]-GGTGAAGGTGTATCCRGAWGC
1341	AHK13'	[70% inicial de CDR H1]-ACTGAAGGACCCACCATAGAC
1342	AHK14'	[70% inicial de CDR H1]-ACTGATGGAGCCACCAGAGAC
1343	AHK15'	[70% inicial de CDR H1]-GCTGATGGAGTAACCAGAGAC
1344	AHK16	[70% inicial de CDR H1]-AGTGAGGGTGTATCCGAAAC
1345	AHK17'	[70% inicial de CDR H1]-GCTGAAGGTGCCTCCAGAAGC
1346	AHK18'	[70% inicial de CDR H1]-AGAGACACTGTCCCCGGAGAT

5 La PCR se lleva a cabo con de AH1 a AH10 en combinación con de AHK1' a AHK18' usando el sub-banco 5 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 5 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 5.

10 A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 6 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 44 y la tabla 45 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

15 Tabla 44. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR2 de cadena pesada (definición de Kabat) (para la sub-biblioteca 6):

1347	BHK1	[70% final de CDR H1]-TGGGTGCGACAGGCYCTGGA
1348	BHK2	[70% final de CDR H1]-TGGGTGCGMCAGGCCCCCGGA
1349	BHK3	[70% final de CDR H1]-TGGATCCGTCAGCCCCCAGGR
1350	BHK4	[70% final de CDR H1]-TGGRTCCGCCAGGCTCCAGGG
1351	BHK5	[70% final de CDR H1]-TGGATCCGSCAGCCCCCAGGG
1352	BHK6	[70% final de CDR H1]-TGGGTCCGSCAAGCTCCAGGG
1353	BHK7	[70% final de CDR H1]-TGGGTCCRTCARGCTCCRGGR
1354	BHK8	[70% final de CDR H1]-TGGGTSCGMCARGCYACWGGA
1355	BHK9	[70% final de CDR H1]-TGGKTCCGCCAGGCTCCAGGS

1356	BHK10	[70% final de CDR H1]-TGGATCAGGCAGTCCCCATCG
1357	BHK11	[70% final de CDR H1]-TGGGCCCCGCAAGGCTCCAGGA
1358	BHK12	[70% final de CDR H1]-TGGATCCGCCAGCACCCAGGG
1359	BHK13	[70% final de CDR H1]-TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGG
1360	BHK14	[70% final de CDR H1]-TGGGTGCGCCAGATGCCCGGG
1361	BHK15	[70% final de CDR H1]-TGGGTGCGACAGGCTCGTGGA
1362	BHK16	[70% final de CDR H1]-TGGATCCGGCAGCCCCCGGG
1363	BHK17	[70% final de CDR H1]-TGGGTGCCACAGGCCCTGGA

Tabla 45. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR2 de cadena pesada (definición de Kabat) (para la sub-biblioteca 6):

1364	BHK1'	[70% inicial de CDR H2]-TCCCATCCACTCAAGCCYTTG
1365	BHK2'	[70% inicial de CDR H2]-TCCCATCCACTCAAGCSTT
1366	BHK3'	[70% inicial de CDR H2]-WGAGACCCACTCCAGCCCCTT
1367	BHK4'	[70% inicial de CDR H2]-CCAATCCACTCCAGKCCCTT
1368	BHK5'	[70% inicial de CDR H2]-TGAGACCCACTCCAGRCCCTT
1369	BHK6'	[70% inicial de CDR H2]-GCCAACCCACTCCAGCCCYTT
1370	BHK7'	[70% inicial de CDR H2]-KGCCACCCACTCCAGCCCCTT
1371	BHK8'	[70% inicial de CDR H2]-TCCAGCCACTCAAGGCCCTC
1372	BHK9'	[70% inicial de CDR H2]-CCCATCCACTCCAGGCCTT
1373	BHK10'	[70% inicial de CDR H2]-TGARACCCACWCCAGCCCCTT
1374	BHK12'	[70% inicial de CDR H2]-MGAKACCCACTCCAGMCCCTT
1375	BRK13'	[70% inicial de CDR H2]-YCCMATCCACTCMAGCCCYTT
1376	BHK14'	[70% inicial de CDR H2]-TCCTATCCACTCAAGGCGTTG
1377	BHK15'	[70% inicial de CDR H2]-TGCAAGCCACTCCAGGGCCTT
1378	BHK16'	[70% inicial de CDR H2]-TGAAACATATTCCAGTCCCTT
1379	BHK17'	[70% inicial de CDR H2]-CGATACCCACTCCAGCCCCTT

5 La PCR se lleva a cabo con de BHK1 a BHK17 en combinación con de BHK1' a BHK17' usando el sub-banco 6 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 6 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 6.

10 A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 7 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 46 y la tabla 47 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

15 Tabla 46. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR3 de cadena pesada (definición de Kabat) (para la sub-biblioteca 7):

1380	CHK1	[70% final de CDR H2]-AGAGTCACCATGACCAGGRAC
1381	CHK2	[70% final de CDR H2]-AGGCTCACCATCWCCAAGGAC
1382	CHK3	[70% final de CDR H2]-CGAGTYACCATATCAGTAGAC
1383	CHK4	[70% final de CDR H2]-CGATTCACCATCTCCAGRGAC
1384	CHK5	[70% final de CDR H2]-AGATTCACCATCTCMAGAGA
1385	CHK6	[70% final de CDR H2]-MGGTTCACCATCTCCAGAGA
1386	CHK7	[70% final de CDR H2]-CGATTCAYCATCTCCAGAGA
1387	CHK8	[70% final de CDR H2]-CGAGTCACCATRTCMGTAGAC

1388	CHK9	[70% final de CDR H2]-AGRGTCACCATKACCAGGGAC
1389	CHK10	[70% final de CDR H2]-CAGGTCACCATCTCAGCCGAC
1390	CHK11	[70% final de CDR H2]-CGAATAACCATCAACCCAGAC
1391	CHK12	[70% final de CDR H2]-CGGTTTGTCTTCTCCATGGAC
1392	CHK13	[70% final de CDR H2]-AGAGTCACCATGACCGAGGAC
1393	CHK14	[70% final de CDR H2]-AGAGTCACGATTACCGCGGAC
1394	CHK15	[70% final de CDR H2]-AGAGTCACCATGACCACAGAC

Tabla 47. Anticuerpo de FR3 de cadena pesada (definición de Kabat) (para la sub-biblioteca 7)

1395	CHK1'	[70% inicial de CDR H3]-TCTAGYACAGTAATACACGGC
1396	CHK2'	[70% inicial de CDR H3]-TCTCGCACAGTAATACAYGGC
1397	CHK3'	[70% inicial de CDR H3]-TCTYGCACAGTAATACACAGC
1398	CHK4'	[70% inicial de CDR H3]-TGYYGCACAGTAATACACGGC
1399	CHK5'	[70% inicial de CDR H3]-CCGTGCACARTAATAYGTGGC
1400	CHK6'	[70% inicial de CDR H3]-TCTGGCACAGTAATACACGGC
1401	CHK7'	[70% inicial de CDR H3]-TGTGGTACAGTAATACACGGC
1402	CHK8'	[70% inicial de CDR H3]-TCTCGCACAGTGATACAAGGC
1403	CHK9'	(70% inicial de CDR H3)-TTTTGCACAGTAATACAAGGC
1404	CHK10'	[70% inicial de CDR H3]-TCTTGCACAGTAATACATGGC
1405	CHK11'	[70% inicial de CDR H3]-GTGTGCACAGTAATATGTGGC
1406	CHK12'	[70% inicial de CDR H3]-TTTCGCACAGTAATATACGGC
1407	CHK13'	[70% inicial de CDR H3]-TCTCACACAGTAATACACAGC

5 La PCR se lleva a cabo con de CHK1 a CHK15 en combinación con de CHK1' a CHK13' usando el sub-banco 7 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 7 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 7.

10 A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 8 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 48 y la tabla 49 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

Tabla 48. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR1 de cadena pesada (definición de Chothia) (para la sub-biblioteca 8):

1408	AH1	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT
1409	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1410	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1411	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1412	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1413	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1414	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1415	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1416	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1417	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

15 Tabla 49. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR1 de cadena pesada (definición de Chothia) (para la sub-biblioteca 8)

1418	AHC1'	[70% inicial de CDR H1]-RGAARCCTTGCAGGAGACCTT
------	-------	---

1419	AHC2'	[70% inicial de CDR H1]-RGAAGCCTTGCAGGAAACCTT
1420	AHC3'	[70% inicial de CDR H1]-AGATGCCTTRGCAGGAAACCTT
1421	AHC4'	[70% inicial de CDR H1]-AGAGAMGGTGCAGGTCAGCGT
1422	AHC5'	[70% inicial de CDR H1]-AGASGCTGCACAGGAGAGTCT
1423	AHC6'	[70% inicial de CDR H1]-AGAGACAGTRCAGGTGAGGGA
1424	AHC7'	[70% inicial de CDR H1]-AKAGACAGCGCAGGTGAGGGA
1425	AHC8'	[70% inicial de CDR H1]-AGAGAAGGTGCAGGTCACTGT
1426	AHC9'	[70% inicial de CDR H1]-AGAAGCTGTACAGGAGAGTCT
1427	AHC10'	[70% inicial de CDR H1]-AGAGGCTGCACAGGAGAGTTT
1428	AHC12'	[70% inicial de CDR H1]-AGAACCCTTACAGGAGATCTT
1429	AHC13'	[70% inicial de CDR H1]-GGAGATGGCACAGGTGAGTGA

La PCR se lleva a cabo con de AH1 a AH10 en combinación con de AHC1' a AHC13' usando el sub-banco 8 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 8 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 8.

5 A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 9 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 50 y la tabla 51 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

10 Tabla 50. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR2 de cadena pesada (definición de Chothia) (para la sub-biblioteca 9):

1430	BHC1	[70% final de CDR H1]-TATGGYATSAGCTGGGTGCGM
1431	BHC2	[70% final de CDR H1]-ATGKGTGTGAGCTGGATCCGT
1432	BHC3	[70% final de CDR H1]-TACTACTGGRGCTGGATCCGS
1433	BHC4	[70% final de CDR H1]-TATGCYATSAGCTGGGTSCGM
1434	BHC5	[70% final de CDR H1]-TCTGCTATGCASTGGGTSCGM
1435	BHC6	[70% final de CDR H1]-TATGCYATGCAYTGGGTSCGS
1436	BHC7	[70% final de CDR H1]-CGCTACCTGCACTGGGTGCGA
1437	BHC8	[70% final de CDR H1]-TTATCCATGCACTGGGTGCGA
1438	BHC9	[70% final de CDR H1]-GCCTGGATGAGCTGGGTCCGC
1439	BHC10	[70% final de CDR H1]-GCTGCTTGGAACTGGATCAGG
1440	BHC11	[70% final de CDR H1]-AATGAGATGAGCTGGATCCGC
1441	BHC12	[70% final de CDR H1]-AACTACATGAGCTGGGTCCGC
1442	BHC13	[70% final de CDR H1]-AACTGGTGGGGCTGGATCCGG
1443	BHC14	[70% final de CDR H1]-GTGGGTGTGGGCTGGATCCGT
1444	BHC15	[70% final de CDR H1]-CACTACATGGACTGGGTCCGC
1445	BHC16	[70% final de CDR H1]-AGTGACATGAACTGGGCCCGC
1446	BHC17	[70% final de CDR H1]-AGTGACATGAACTGGGTCCAT
1447	BHC18	[70% final de CDR H1]-TATACCATGCACTGGGTCCGT
1448	BHC19	[70% final de CDR H1]-TATGCTATGCACTGGGTCCGC
1449	BHC20	[70% final de CDR H1]-TATGCTATGAGCTGGTCCGC
1450	BHC21	[70% final de CDR H1]-TATAGCATGAACTGGGTCCGC
1451	BHC22	[70% final de CDR H1]-TATGGCATGCACTGGGTCCGC
1452	BHC23	[70% final de CDR H1]-TATTGGATGAGCTGGGTCCGC

1453	BHC24	[70% final de CDR H1]-TACGACATGCACTGGGTCCGC
1454	BHC25	[70% final de CDR H1]-TACTACATGAGCTGGATCCGC
1455	BHC26	[70% final de CDR H1]-TACTGGATGCACTGGGTCCGC
1456	BHC27	[70% final de CDR H1]-TACTGGATCGGCTGGGTGCGC
1457	BHC28	[70% final de CDR H1]-TACTATATGCACTGGGTGCGA
1458	BHC29	[70% final de CDR H1]-TATGATATCAACTGGGTGCGA
1459	BHC30	[70% final de CDR H1]-TATGGTATGAATTGGGTGCCA

Tabla 51. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR2 de cadena pesada (definición de Chothia) (para la sub-biblioteca 9)

1460	BHC1'	[70% inicial de CDR H2]-AATASCWGAGACCCACTCCAG
1461	BHC2'	[70% inicial de CDR H2]-AATAASWGAGACCCACTCCAG
1462	BHC3'	[70% inicial de CDR H2]-GMTCCATCCCATCCACTCAAG
1463	BHC4'	[70% inicial de CDR H2]-GATAACKCCCAATCCACTCCAG
1464	BHC5'	[70% inicial de CDR H2]-GATRTACCCAATCCACTCCAG
1465	BHC6'	[70% inicial de CDR H2]-AATGWGTGCAAGCCACTCCAG
1466	BHC7'	[70% inicial de CDR H2]-AAYACCYGAKACCCACTCCAG
1467	BHC8'	[70% inicial de CDR H2]-AATGKATGARACCCACTCCAG
1468	BHC9'	[70% inicial de CDR H2]-ARTACGGCCAACCCACTCCAG
1469	BHC10'	[70% inicial de CDR H2]-AAAACCTCCCATCCACTCAAG
1470	BHC12'	[70% inicial de CDR H2]-GATTATTCCCATCCACTCAAG
1471	BHC13'	[70% inicial de CDR H2]-GATCCATCCTATCCACTCAAG
1472	BHC14'	[70% inicial de CDR H2]-GAACCATCCCATCCACTCAAG
1473	BHC15'	[70% inicial de CDR H2]-GATCCCTCCCATCCACTCAAG
1474	BHC16'	[70% inicial de CDR H2]-CATCCATCCCATCCACTCAAG
1475	BHC17'	[70% inicial de CDR H2]-TGTCCCTCCAGCCACTCAAG
1476	BHC18'	[70% inicial de CDR H2]-AATACGTGAGACCCACACCAG
1477	BHC19'	[70% inicial de CDR H2]-AATAGCTGAAACATATTCCAG
1478	BHC20'	[70% inicial de CDR H2]-GATTTCCCAATCCACTCCAG
1479	BHC21'	[70% inicial de CDR H2]-GATGATCCCATCCACTCCAG
1480	BHC22'	[70% inicial de CDR H2]-TATAACTGCCACCCACTCCAG
1481	BHC23'	[70% inicial de CDR H2]-AATGAAACCTACCCACTCCAG
1482	BHC24'	[70% inicial de CDR H2]-TATGTTGGCCACCCACTCCAG

5 La PCR se lleva a cabo con de BHC1 a BHC30 en combinación con de BHC1' a BHC24' usando el sub-banco 9 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 9 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 9.

10 A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 10 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 52 y la tabla 53 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

Tabla 52. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR3 de cadena pesada (definición de Chothia) (para la sub-biblioteca 10):

1483	CHC1	[70% final de CDR H2]-ACCAACTACAACCCSTCCCTC
1484	CHC2	[70% final de CDR H2]-ATATACTACGCAGACTCWGTG

1485	CHC3	[70% final de CDR H2]-ACATACTAYGCAGACTCYGTG
1486	CHC4	[70% final de CDR H2]-ACMAACTACGCACAGAARTTC
1487	CHC5	[70% final de CDR H2]-ACAAACTATGCACAGAAGYT
1488	CHC6	[70% final de CDR H2]-ACARGCTAYGCACAGAAGTTC
1489	CHC7	[70% final de CDR H2]-AYAGGYTATGCRGACTCTGTG
1490	CHC8	[70% final de CDR H2]-AAATMCTACAGCACATCTCTG
1491	CHC9	[70% final de CDR H2]-AAATACTATGTGGACTCTGTG
1492	CHC10	[70% final de CDR H2]-CCAACATATGCCAGGGCTTC
1493	CHC11	[70% final de CDR H2]-GCAAACACTACGCACAGAAGTTC
1494	CHC12	[70% final de CDR H2]-AAATACTATGCAGACTCCGTG
1495	CHC13	[70% final de CDR H2]-AAGCGCTACAGCCCATCTCTG
1496	CHC14	[70% final de CDR H2]-AATGATTATGCAGTATCTGTG
1497	CHC15	[70% final de CDR H2]-ACCAGATACAGCCCGTCCCTTC
1498	CHC16	[70% final de CDR H2]-ACAGAATACGCCGCGTCTGTG
1499	CHC17	[70% final de CDR H2]-ACGCACTATGCAGACTCTGTG
1500	CHC18	[70% final de CDR H2]-ACGCACTATGTGGACTCCGTG
1501	CHC19	[70% final de CDR H2]-ACAATCTACGCACAGAAGTTC
1502	CHC20	[70% final de CDR H2]-ACAAAATATTCACAGGAGTTC
1503	CHC21	[70% final de CDR H2]-ACATACTACGCAGACTCCAGG
1504	CHC22	[70% final de CDR H2]-ACAAGCTACGCGGACTCCGTG
1505	CHC23	[70% final de CDR H2]-ACATATTATGCAGACTCTGTG
1506	CHC24	[70% final de CDR H2]-ACAGACTACGCTGCACCCGTG
1507	CHC25	[70% final de CDR H2]-ACAGCATATGCTGCGTCCGTG
1508	CHC26	[70% final de CDR H2]-ACATACTATCCAGGCTCCGTG
1509	CHC27	[70% final de CDR H2]-ACCTACTACAACCCGTCCCTC

Tabla 53. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR3 de cadena pesada (definición de Chothia) (para la sub-biblioteca 10):

1510	CHC1'	[70% inicial de CDR H3]-TSTYGCACAGTAATACACGGC
1511	CHC2'	[70% inicial de CDR H3]-TCTYGCACAGTAATACATGGC
1512	CHC3'	[70% inicial de CDR H3]-TCTAGYACAGTAATACACGGC
1513	CHC4'	[70% inicial de CDR H3]-CCGTGCACARTAAATAYGTGGC
1514	CHC5'	[70% inicial de CDR H3]-TCTYGCACAGTAATACACAGC
1515	CHC6'	[70% inicial de CDR H3]-GTGTGCACAGTAATATGTGGC
1516	CHC7'	[70% inicial de CDR H3]-TGCCGCACAGTAATACACGGC
1517	CHC8'	[70% inicial de CDR H3]-TGTGGTACAGTAATACACGGC
1518	CHC9'	[70% inicial de CDR H3]-TCTCACACAGTAATACACAGC
1519	CHC10'	[70% inicial de CDR H3]-TCTCGCACAGTGATACAAGGC
1520	CHC11'	[70% inicial de CDR H3]-TTTCGCACAGTAATATACGGC
1521	CHC12'	[70% inicial de CDR H3]-TCTGGCACAGTAATACACGGC
1522	CHC13'	[70% inicial de CDR H3]-TTTTGCACAGTAATACAAGGC

5 La PCR se lleva a cabo con de CHC1 a CHC27 en combinación con de CHC1' a CHC13' usando el sub-banco 10 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 10 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 10.

A modo de ejemplo pero no de limitación, la sub-biblioteca combinatoria 11 se construye usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos en la tabla 54 y la tabla 55 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia) en los que K= G o T, M= A o C, R= A o G, S= C o G, W= A o T e Y= C o T.

Tabla 54. Cebadores directos específicos de anticuerpo de FR4 de cadena pesada (definición de Kabat y de Chothia) (para la sub-biblioteca 11):

1523	DH1	[70% final de CDR H3]-TGGGGCCARGGMACCCTGGTC
1524	DH2	[70% final de CDR H3]-TGGGGSCAAGGGACMAYGGTC
1525	DH3	[70% final de CDR H3]-TGGGGCCGTGGCACCTGGTC

Tabla 55. Cebadores inversos específicos de anticuerpo de FR4 de cadena pesada (definición de Kabat y de Chothia) (para la sub-biblioteca 11)

1526	DH1'	TGAGGAGACRGTGACCAGGGT
1527	DH2'	TGARGAGACGGTGACCRKTGT
1528	DH3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

La PCR se lleva a cabo con de DH1 a DHC3 en combinación con de DH1' a DH3' usando el sub-banco 11 como molde. Esto genera la sub-biblioteca combinatoria 11 o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en la tabla 11.

En algunas realizaciones, pueden construirse nueve sub-bibliotecas combinatorias usando ligación directa de CDR no humanas y las regiones de entramado humanas de los sub-bancos. Por ejemplo, las sub-bibliotecas combinatorias 1', 2' y 3' se construyen por separado mediante ligación directa de las CDR no humanas L1, L2 y L3 (en una forma de cadena sencilla o de cadena doble) con los sub-bancos 1, 2 y 3, respectivamente. En una realización, las CDR no humanas (L1, L2 y L3) son ácidos nucleicos de cadena sencilla. En otra realización, las CDR no humanas (L1, L2 y L3) son ácidos nucleicos de cadena doble. Alternativamente, pueden obtenerse las sub-bibliotecas combinatorias 1', 2' y 3' mediante ligación directa de las CDR no humanas (L1, L2 y L3) en una forma de cadena sencilla (+) con el ácido nucleico 1-46 indicado en la tabla 1, el ácido nucleico 47-92 indicado en la tabla 2 y el ácido nucleico 93-138 indicado en la tabla 3, respectivamente.

En algunas realizaciones, se construyen las sub-bibliotecas combinatorias 5' y 6' por separado mediante ligación directa de las CDR no humanas H1 y H2 (en una forma de cadena sencilla o de cadena doble y según la definición de Kabat) con los sub-bancos 5 y 6, respectivamente. Alternativamente, pueden obtenerse las sub-bibliotecas 5' y 6' mediante ligación directa de las CDR no humanas H1 y H2 (según la definición de Kabat y en una forma de cadena sencilla (+)) con los ácidos nucleicos de 144 a 187 indicados en la tabla 5 y de 188 a 231 indicados en la tabla 6, respectivamente.

En algunas realizaciones, se construyen las sub-bibliotecas combinatorias 8' y 9' por separado mediante ligación directa de las CDR no humanas H1 y H2 (en una forma de cadena sencilla o de cadena doble y según la definición de Chothia) con los sub-bancos 8 y 9, respectivamente. Alternativamente, pueden obtenerse las sub-bibliotecas 8' y 9' mediante ligación directa de las CDR no humanas H1 y H2 (según la definición de Chothia y en una forma de cadena sencilla (+)) con los ácidos nucleicos de 276 a 319 indicados en la tabla 8 y de 320 a 363 de la tabla 9, respectivamente.

Se construyen las sub-bibliotecas combinatorias 11' y 12' por separado mediante ligación directa de la CDR no humana H3 (en una forma de cadena sencilla o de cadena doble) con el sub-banco 7 (definición de Kabat) y 10 (definición de Chothia), respectivamente. Alternativamente, pueden obtenerse las sub-bibliotecas 11' y 12' mediante ligación directa de la CDR no humana H3 (en una forma de cadena sencilla (+)) con los ácidos nucleicos de 232 a 275 indicados en la tabla 7 y de 364 a 407 de la tabla 10, respectivamente.

La ligación directa de fragmentos de ADN puede llevarse a cabo según protocolos convencionales. Puede ir seguida por purificación/separación de los productos ligados a partir de los no ligados.

2.5 Construcción de bibliotecas combinatorias

Se construyen bibliotecas combinatorias ensamblando entre sí sub-bibliotecas combinatorias de región de cadena ligera variable o región de cadena pesada variable correspondientes. Por ejemplo, puede construirse la biblioteca combinatoria de regiones de entramado de línea germinal de cadena kappa humana (biblioteca combinatoria 1) ensamblando entre sí las sub-bibliotecas 1, 2, 3 y 4 mediante regiones solapantes en las CDR tal como se describe a continuación; pueden construirse dos bibliotecas combinatorias de regiones de entramado de línea germinal de

cadena pesada humana (una para la definición de Kabat de las CDR, biblioteca combinatoria 2, y una para la definición de Chothia de las CDR, biblioteca combinatoria 3) ensamblando entre sí las sub-bibliotecas 5, 6, 7, 11 (definición de Kabat) o las sub-bibliotecas 8, 9, 10, 11 (definición de Chothia) mediante regiones solapantes en las CDR tal como se describe a continuación.

5 En una realización, la construcción de la biblioteca combinatoria 1 se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 56 y la tabla 57 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', el nombre del cebador seguido por la secuencia):

10 Tabla 56. Cebadores directos de cadena ligera (para la biblioteca combinatoria 1):

1529	AL1	GATGTTGTGATGACWCAGTCT
1530	AL2	GACATCCAGATGAYCCAGTCT
1531	AL3	GCCATCCAGWTGACCCAGTCT
1532	AL4	GAAATAGTGATGAYGCAGTCT
1533	AL5	GAAATTGTGTTGACRCAGTCT
1534	AL6	GAKATTGTGATGACCCAGACT
1535	AL7	GAAATTGTRMTGACWCAGTCT
1536	AL8	GAYATYGTGATGACYCAGTCT
1537	AL9	GAAACGACACTCACGCAGTCT
1538	AL10	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
1539	AL11	AACATCCAGATGACCCAGTCT
1540	AL12	GCCATCCGGATGACCCAGTCT
1541	AL13	GTCATCTGGATGACCCAGTCT

Tabla 57. Cebadores inversos de cadena ligera (para la biblioteca combinatoria 1):

1542	DL1'	TTTGATYTCCACCTTGGTCCC
1543	DL2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
1544	DL3'	TTTGATATCCACTTTGGTCCC
1545	DL4'	TTTAATCTCCAGTCGTGTC

15 La PCR se lleva a cabo con de AL1 a AL13 en combinación con de DL1' a DL4' usando las sub-bibliotecas 1, 2, 3 y 4 juntas o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en las tablas 1, 2, 3 y 4 como molde. Esto genera la biblioteca combinatoria 1.

20 En una realización, la construcción de las bibliotecas combinatorias 2 y 3 se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 58 y la tabla 59 (mostrados todos en la orientación de 5' a 3', nombre seguido por secuencia):

Tabla 58. Cebadores directos de cadena pesada (para las bibliotecas combinatorias 2 y 3, definición de Kabat y de Chothia):

1546	AH1	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT
1547	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1548	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCT
1549	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1550	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1551	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1552	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1553	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1554	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1555	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

Tabla 59. Cebadores inversos de cadena pesada (para la biblioteca combinatoria 2 y 3, definición de Kabat y de Chothia):

1556	DH1'	TGAGGAGACRGTGACCAGGGT
1557	DH2'	TGARGAGACGGTGACCRTKGT
1558	DH3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

5 La PCR se lleva a cabo con de AH1 a AH10 en combinación con de DH1' a DH3' usando las sub-bibliotecas 5, 6, 7, 11 juntas, o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en las tablas 5, 6, 7 y 11, o las sub-bibliotecas 8, 9, 10, 11, o un agrupamiento de oligonucleótidos correspondiente a secuencias descritas en las tablas 8, 9, 10 y 11, juntas como molde. Esto genera la biblioteca combinatoria 2 ó 3, respectivamente.

10 En otra realización, se construyen bibliotecas combinatorias mediante ligación directa. Por ejemplo, se construye una biblioteca combinatoria de regiones de entramado de línea germinal de cadena kappa humana (biblioteca combinatoria 1') mediante ligación secuencial directa de las sub-bibliotecas 1', 2', 3' y del sub-banco 4 (o los ácidos nucleicos de 139 a 143, véase la tabla 4) entre sí. Esto va seguido por una etapa de reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos descritos en la tabla 60 y la tabla 61. Se construyen dos bibliotecas combinatorias de regiones de entramado de línea germinal de cadena pesada humana (una para la definición de Kabat de las CDR, biblioteca combinatoria 2'; y una para la definición de Chothia de las CDR, biblioteca combinatoria 3') mediante ligación secuencial directa de las sub-bibliotecas 5', 6', 11' y del sub-banco 11 (definición de Kabat) o de las sub-bibliotecas 8', 9', 12' y del sub-banco 11 (definición de Chothia) entre sí. Alternativamente, puede sustituirse el sub-banco 11 por los ácidos nucleicos de 408 a 412 (véase la tabla 11) en las reacciones de ligación. Esto va seguido por una etapa de reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos descritos en la tabla 62 y la tabla 63.

Tabla 60. Cebadores directos de cadena ligera (para la biblioteca combinatoria 1'):

1559	AL1	GATGTTGTGATGACWCAGTCT
1560	AL2	GACATCCAGATGAYCCAGTCT
1561	AL3	GCCATCCAGWTGACCCAGTCT
1562	AL4	GAAATAGTGATGAYGCAGTCT
1563	AL5	GAAATTGTGTTGACRCAGTCT
1564	AL6	GAKATTGTGATGACCCAGACT
1565	AL7	GAAATTGTRMTGACWCAGTCT
1566	AL8	GAYATYGTGATGACYCAGTCT
1567	AL9	GAAACGACACTCACGCAGTCT
1568	AL10	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
1569	AL11	AACATCCAGATGACCCAGTCT
1570	AL12	GCCATCCGGATGACCCAGTCT
1571	AL13	GTCATCTGGATGACCCAGTCT

Tabla 61. Cebadores inversos de cadena ligera (para la biblioteca combinatoria 1'):

1572	DL1'	TTTGATYTCCACCTTGGTCCC
1573	DL2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
1574	DL3'	TTTGATATCCACTTTGGTCCC
1575	DL4'	TTTAATCTCCAGTCGTGTC

25 La PCR se lleva a cabo con de AL1 a AL 13 en combinación con de DL1' a DL4' usando las sub-bibliotecas 1', 2', 3' y el sub-banco 4 (o los ácidos nucleicos de 139 a 143, véase la tabla 4) previamente ligados entre sí como molde. Esto genera la biblioteca combinatoria 1'.

30 Tabla 62. Cebadores directos de cadena pesada (para la biblioteca combinatoria 2' y 3', definición de Kabat y de Chothia):

1576	AH1	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT
1577	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT

1578	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1579	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1580	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1581	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1582	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1583	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1584	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1585	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

Tabla 63. Cebadores inversos de cadena pesada (para la biblioteca combinatoria 2' y 3', definición de Kabat y de Chothia):

1586	DH1'	TGAGGAGACRGTGACCAGGGT
1587	DH2'	TGARGAGACGGTGACCRKGT
1588	DH3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

- 5 La PCR se lleva a cabo con de AH1 a AH10 en combinación con de DH1' a DH3' usando las sub-bibliotecas 5', 6', 11' y el sub-banco 11 (o los ácidos nucleicos de 408 a 412, véase la tabla 11) previamente ligados entre sí o las sub-bibliotecas 8', 9', 12' y el sub-banco 11 (o los ácidos nucleicos de 408 a 413, véase la tabla 11) previamente ligados entre sí como molde. Esto genera la biblioteca combinatoria 2' o 3', respectivamente.
- 10 Los sub-bancos de regiones de entramado, sub-bancos de CDR, sub-bibliotecas combinatorias y bibliotecas combinatorias pueden almacenarse para un uso posterior. Los ácidos nucleicos pueden almacenarse en una disolución, como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado. En casos en los que los ácidos nucleicos no se almacenan en una disolución, los ácidos nucleicos pueden reconstituirse (por ejemplo, con agua o solución salina) hasta la concentración apropiada para un uso posterior. Los sub-bancos, sub-bibliotecas combinatorias y bibliotecas combinatorias se almacenan preferiblemente a entre 2°C y 8°C en un recipiente que indica la cantidad y la concentración de los ácidos nucleicos.

2.6 Expresión de las bibliotecas combinatorias

- 20 Las bibliotecas combinatorias pueden expresarse usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, sistema de expresión bacteriano, sistema de expresión de mamífero y sistema de presentación ribosómico *in vitro*.

En realizaciones preferidas, la presente invención abarca el uso de vectores de fago para expresar las bibliotecas combinatorias. Los vectores de fago tienen ventajas particulares de proporcionar un medio para examinar una población muy grande de proteínas presentadas expresadas y de ese modo localizar uno o más clones específicos que codifican para una actividad de unión deseada.

El uso de los vectores de presentación en fagos para expresar una gran población de moléculas de anticuerpo se conoce bien en la técnica y no se revisará en detalle en el presente documento. El método implica generalmente el uso de un sistema de vector de expresión en superficie de fago filamentoso (fagémido) para clonar y expresar especies de anticuerpos de una biblioteca. Véase, por ejemplo, Kang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4363-4366 (1991); Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991); Zebedee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179 (1992); Kang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:11120-11123 (1991); Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461 (1992); Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3576-3580 (1992); Brinkman *et al.*, J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, Gene 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, Advances in Immunology 57:191-280 (1994); la solicitud PCT n.º PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT n.ºs WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes estadounidenses n.ºs 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Un vector de fagémido preferido es una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para, y puede expresar, un polipéptido de fusión que contiene, en el sentido de extremo amino a carboxilo-terminal, (1) un dominio de señal de secreción procariota, (2) un polipéptido heterólogo que define una región variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, y (3) un dominio de anclaje a membrana de fago filamentoso. El vector incluye secuencias de control de la expresión de ADN para expresar el polipéptido de fusión, preferiblemente secuencias de control procariotas.

El anclaje a membrana de fago filamentoso es preferiblemente un dominio de la proteína de cubierta cpIII o cpVIII que puede asociarse con la matriz de una partícula de fago filamentoso, incorporando así el polipéptido de fusión sobre la superficie del fago.

5 Pueden obtenerse anclajes a membrana preferidos para el vector de los fagos filamentosos M13, fl, fd y fagos filamentosos equivalentes. Se encuentran dominios de anclaje a membrana preferidos en las proteínas de cubierta codificadas por el gen III y el gen VIII. (Véase Ohkawa *et al.*, J. Biol. Chem., 256:9951-9958, 1981). El dominio de anclaje a membrana de una proteína de cubierta de fago filamentoso es una porción de la región carboxilo-terminal de la proteína de cubierta e incluye una región de residuos de aminoácido hidrófobos para abarcar una membrana de bicapa lipídica, y una región de residuos de aminoácido cargados que se encuentra normalmente en la cara citoplasmática de la membrana y que se extiende alejándose de la membrana. Para descripciones detalladas de la estructura de partículas de fago filamentoso, sus proteínas de cubierta y ensamblaje de partículas, véanse las revisiones de Rached *et al.*, Microbiol. Rev., 50:401-427 (1986); y Model *et al.*, en "The Bacteriophages: Vol. 2", R. Calendar, ed. Plenum Publishing Co., págs. 375-456 (1988).

La señal de secreción es un dominio peptídico líder de una proteína que dirige la proteína a la membrana periplasmática de bacterias gram negativas. Una señal de secreción preferida es una señal de secreción pelB. (Better *et al.*, Science, 240:1041-1043 (1988); Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5728-5732 (1989); y Mullinax *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:8095-8099 (1990)). Las secuencias de residuos de aminoácido predichas del dominio de señal de secreción de dos variantes de producto génico de pelB de *Erwinia carotova* se describen en Lei *et al.*, Nature, 331:543-546 (1988). Las secuencias de residuos de aminoácido para otros dominios polipeptídicos de señal de secreción de *E. coli* útiles en esta invención se describen en Oliver, *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, Neidhard, F. C. (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1:56-69 (1987).

Las secuencias de control de la expresión de ADN comprenden un conjunto de señales de expresión de ADN para expresar un producto génico estructural e incluyen elementos tanto en 5' como en 3', tal como se conoce, operativamente unidos al gen. Las secuencias de control en 5' definen un promotor para iniciar la transcripción y un sitio de unión al ribosoma operativamente unido al extremo terminal en 5' de la secuencia de ADN traducible en el sentido de 5'. Las secuencias de control en 3' definen al menos un codón de terminación (parada) en marco con y operativamente unido al polipéptido de fusión heterólogo.

Preferiblemente, el vector usado incluye un origen de replicación o replicón procariota, es decir, un secuencia de ADN que tiene la capacidad para dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante de manera extra-cromosómica en una célula huésped procariota, tal como una célula huésped bacteriana, transformada con el mismo. Tales orígenes de replicación se conocen bien en la técnica. Los orígenes de replicación preferidos son aquellos que son eficaces en el organismo huésped. Una célula huésped preferida es *E. coli*. Véase Sambrook *et al.*, en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989).

Además, un replicón procariota, cuando se usa, también puede incluir un ácido nucleico cuya expresión confiere una ventaja selectiva, tal como resistencia a fármaco, a un huésped bacteriano transformado con el mismo. Los genes de resistencia a fármaco bacterianos típicos son aquellos que confieren resistencia a ampicilina, tetraciclina, neomicina/kanamicina o cloranfenicol. Normalmente los vectores también contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de secuencias de ADN traducibles.

En algunos casos, el vector puede realizar la coexpresión de dos cistrones contenidos en el mismo, tales como una secuencia de nucleótidos que codifica para una región de cadena pesada variable y una secuencia de nucleótidos que codifica para una región de cadena ligera variable. La coexpresión se ha logrado en una variedad de sistemas y por tanto no necesita limitarse a ningún diseño particular, siempre que se produzcan cantidades relativas suficientes de los dos productos génicos para permitir el ensamblaje y la expresión de un heterodímero funcional.

Un vector de expresión de ADN puede diseñarse para su manipulación conveniente en forma de una partícula de fago filamentoso que encapsula un genoma. En este caso, un vector de expresión de ADN contiene además una secuencia de nucleótidos que define un origen de replicación de fago filamentoso de tal manera que el vector, tras la presentación del complemento génico apropiado, puede replicarse como un fago filamentoso en forma replicativa de cadena sencilla y empaquetarse dentro de partículas de fago filamentoso. Esta característica proporciona la capacidad de empaquetar el vector de expresión de ADN en partículas de fago para su posterior separación de la partícula, y el vector contenido en la misma, lejos de otras partículas que comprenden una población de partículas de fago.

Un origen de replicación de fago filamentoso es una región del genoma de fago, tal como se conoce, que define sitios para el inicio de la replicación, terminación de la replicación y empaquetamiento de la forma replicativa producida mediante replicación (véase por ejemplo, Rasched *et al.*, Microbiol. Rev., 50:401-427, 1986; y Horiuchi, J. Mol. Biol., 188:215-223, 1986). Un origen de replicación de fago filamentoso preferido es un origen de replicación de

fagos M13, fl o fd (Short *et al.*, Nucl. Acids Res., 16:7583-7600, 1988).

El método para producir una molécula de inmunoglobulina heterodimérica implica generalmente (1) introducir una gran población de vectores de presentación que pueden expresar cada uno diferentes sitios de unión supuestos presentados en una proteína de presentación en superficie de fagémido en una partícula de fago filamentoso, (2) expresar la proteína de presentación y el sitio de unión sobre la superficie de una partícula de fago filamentoso, y (3) aislar (seleccionar) la partícula de fago expresada en superficie usando técnicas de afinidad tales como cribado de partículas de fago frente a un antígeno preseleccionado, aislando así una o más especies de fagémidos que contienen una proteína de presentación que contiene un sitio de unión que se une a un antígeno preseleccionado.

El aislamiento de un vector particular que puede expresar un sitio de unión a anticuerpo de interés implica la introducción del vector de expresión dicistrónico que puede expresar la proteína de presentación de fagémido en una célula huésped que permite la expresión de genes de fago filamentoso y el ensamblaje de partículas de fago. Normalmente, el huésped es *E. coli*. Posteriormente, se introduce un genoma de fago cooperador en la célula huésped que contiene el vector de expresión de fagémido para proporcionar el complemento génico necesario para permitir que se ensamblen partículas de fago.

La célula huésped resultante se cultiva para permitir que se expresen los genes de proteína de presentación y los genes de fago introducidos, y para que se ensamblen partículas de fago y se desprendan de la célula huésped. Entonces se recogen (obtienen) las partículas de fago desprendidas de los medios de cultivo de la célula huésped y se examinan para determinar propiedades de unión a anticuerpo deseables. Normalmente, se "criban" las partículas recogidas para determinar la unión con un antígeno preseleccionado. Entonces se recogen las partículas que se unen fuertemente y se aíslan por clonación especies individuales de partículas y se examinan adicionalmente para determinar la unión al antígeno. Se seleccionan los fagos que producen un sitio de unión con una especificidad de unión a antígeno deseada.

Tras la selección de fagos, pueden aislarse las regiones del fago que codifican para anticuerpo y usarse para generar anticuerpos completos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, tal como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los dados a conocer en la publicación internacional n.º WO 92/22324; Mullinax *et al.*, BioTechniques 12(6):864-869 (1992); y Sawai *et al.*, AJRI 34:26-34 (1995); y Better *et al.*, Science 240:1041-1043 (1988). Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir anticuerpos y Fv de cadena sencilla incluyen las descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, PNAS 90:7995-7999 (1993); y Skerra *et al.*, Science 240:1038-1040 (1988).

Una célula huésped puede contener un vector o una secuencia de nucleótidos de esta invención, la célula huésped puede ser *E. coli*.

Puede clonarse una biblioteca combinatoria en un vector de fago basado en M 13. Este vector permite la expresión de fragmentos Fab que contienen el primer dominio constante de la cadena pesada κ 1 humana y el dominio constante de la cadena ligera kappa (κ) humana bajo el control del promotor lacZ. Esto puede llevarse a cabo mediante mutagénesis por hibridación tal como se describe en Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 213-233; Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212; y Kunkel *et al.*, 1987, Methods Enzymol. 154, 367-382. En resumen, se hibridan cadenas negativas purificadas correspondientes a las cadenas pesada y ligera que van a clonarse con dos regiones que contienen cada una un bucle palindrómico. Estos bucles contienen un sitio XbaI único que permite la selección de los vectores que contienen las cadenas tanto V_L como V_H fusionadas en marco con la región constante kappa (κ) humana y la primera región constante κ 1 humana, respectivamente (Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 213-233, Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212). Entonces se somete el ADN sintetizado a electroporesis en XL1-blue para determinar la formación de placas de lisis en césped bacteriano de XL1-blue o la producción de fragmentos Fab tal como se describe en Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212.

Además de los sistemas de expresión bacterianos/en fagos, pueden usarse otros sistemas de vectores huésped para expresar las bibliotecas combinatorias. Estos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de célula de mamífero transfectados con un vector o infectados con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de célula de insecto transfectados con un vector o infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con ADN, ADN de plásmido o ADN de cósmido. Véase por ejemplo, Verma *et al.*, J Immunol Methods. 216(1-2):165-81 (1998).

Los elementos de expresión de vectores varían en cuanto a sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema de vector huésped usado, puede usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. En un aspecto preferido, cada ácido nucleico de una biblioteca combinatoria es parte de un vector de expresión que expresa la cadena pesada y/o ligera humanizada o regiones variables de cadena pesada y/o ligera humanizadas en un huésped adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, operativamente unidos a la región que codifica para anticuerpo, siendo dicho promotor

inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. (Véase la sección 5.7 para más detalles). En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias que codifican para anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican para anticuerpo (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435-438).

Las bibliotecas combinatorias también pueden expresarse usando sistemas *in vitro*, tales como los sistemas de presentación ribosómicos (véase la sección 5.6 para más detalles).

2.7 Selección de anticuerpos humanizados

Las bibliotecas combinatorias expresadas pueden examinarse para determinar unión al antígeno reconocido por el anticuerpo donador usando cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, una biblioteca de presentación en fago construida y expresada tal como se describe en las secciones 5.4 y 5.6, respectivamente, se examina para determinar la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo donador, y puede aislarse el fago que expresa dominio V_H y/o V_L con unión significativa al antígeno a partir de una biblioteca usando las técnicas de examen convencionales (por ejemplo tal como se describe en Harlow, E., y Lane, D., 1988, citado anteriormente Gherardi, E *et al.* 1990. J. Immunol. meth. 126 págs. 61-68). Las partículas de fago desprendidas de células huésped se recogen (obtienen) de los medios de cultivo de la célula huésped y se examinan para determinar propiedades de unión de anticuerpo deseables. Normalmente, se "criban" las partículas recogidas para determinar la unión con un antígeno preseleccionado. Entonces se recogen las partículas que se unen fuertemente, se aíslan por clonación especies individuales de partículas y se examinan adicionalmente para determinar la unión al antígeno. Se seleccionan los fagos que producen un sitio de unión con una especificidad de unión a antígeno deseada. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado de la invención tiene una afinidad de al menos $1 \times 10^6 M^{-1}$, preferiblemente al menos $1 \times 10^7 M^{-1}$, al menos $1 \times 10^8 M^{-1}$ o al menos $1 \times 10^9 M^{-1}$ para un antígeno de interés.

Preferiblemente, en primer lugar se examina una biblioteca de fagos usando un ensayo de hibridación en placa modificado, denominado hibridación de captura. Véase Watkins *et al.*, 1997, Anal. Biochem., 253:37-45. En resumen, se siembran en placas bacterias infectadas por fagos en céspedes de agar sólido y posteriormente se recubren con filtros de nitrocelulosa que se han recubierto con un reactivo específico para Fab (por ejemplo, un anticuerpo anti-Fab). Tras la captura de cantidades casi uniformes de Fab expresado en fagos, se examinan los filtros con sonda con proteína de fusión antígeno-Ig deseada a una concentración sustancialmente inferior al valor de Kd del Fab.

Alternativamente, las bibliotecas combinatorias se expresan y se examinan usando sistemas *in vitro*, tales como los sistemas de presentación ribosómicos (véase, por ejemplo, Graddis *et al.*, Curr Pharm Biotechnol. 3(4):285-97 (2002); Hanes y Plucthau PNAS USA 94:4937-4942 (1997); He, 1999, J. Immunol. Methods, 231:105; Jermutus *et al.* (1998) Current Opinion in Biotechnology, 9:534-548. El sistema de presentación ribosómico funciona traduciendo una biblioteca de anticuerpo o fragmento del mismo *in vitro* sin permitir la liberación ni del anticuerpo (o fragmento del mismo) ni del ARNm del ribosoma de traducción. Esto se hace posible eliminando el codón de parada y usando un sistema de tampón estabilizante de ribosoma. El anticuerpo traducido (o fragmento del mismo) también contiene una extensión de polipéptido unión C-terminal con el fin de facilitar que el anticuerpo recién sintetizado o fragmento del mismo emerja del túnel ribosómico y se pliegue de manera independiente. El anticuerpo plegado o fragmento del mismo puede examinarse o capturarse con un antígeno análogo. Esto permite la captura del ARNm, que posteriormente se enriquece *in vitro*. Los sistemas de reticulocito de conejo y *E. coli* se usan comúnmente para la presentación ribosómica.

También pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, PROfusion™ (patente estadounidense n.º 6.281.344, Phyllos Inc., Lexington, MA), presentación covalente (publicación internacional n.º WO 9837186, Actinova Ltd., Cambridge, R.U.).

Un antígeno puede unirse a soporte(s) sólido(s), que puede(n) proporcionarse mediante una placa Petri, perlas de cromatografía o perlas magnéticas. Tal como se usa en el presente documento, el término "soporte sólido" no se limita a ningún tipo específico de soporte sólido. En vez de eso, hay un gran número de soportes disponibles y los conoce un experto en la técnica. Los soportes sólidos incluyen geles de sílice, resinas, películas de plástico derivatizadas, perlas de vidrio, algodón, perlas de plástico, perlas de poliestireno, geles de alúmina y polisacáridos. Un soporte sólido adecuado puede seleccionarse basándose en el uso final deseado y la idoneidad para diversos protocolos sintéticos. Por ejemplo, para la síntesis de péptidos, un soporte sólido puede ser una resina tal como resina de p-metilbenzohidrilamina (pMBHA) (Peptides International, Louisville, KY), poliestirenos (por ejemplo, resina PAM obtenida de Bachem Inc., Peninsula Laboratories, etc.), incluyendo clorometilpoliestireno, hidroximetilpoliestireno y aminometilpoliestireno, estireno-co-divinilbenceno con injerto de poli(dimetilacrilamida) (por ejemplo, resina POLYHIPE, obtenida de Aminotech, Canada), resina de poliamida (obtenida de Peninsula Laboratories), resina de poliestireno con injerto de polietilenglicol (por ejemplo, TENTAGEL o ARGOGEL, Bayer, Tubingen, Alemania) resina de polidimetilacrilamida (obtenida de Milligen/Bioscience, California) o Sepharose (Pharmacia, Suecia).

Entonces se hace pasar la biblioteca combinatoria sobre el antígeno y tras el lavado se conservan aquellos anticuerpos individuales que se unen y opcionalmente se detectan con un sistema de detección. Si se retiran muestras de población unida en condiciones cada vez más rigurosas, la afinidad de unión representada en cada muestra aumentará. Las condiciones de rigurosidad aumentada pueden obtenerse, por ejemplo, aumentando el tiempo de empapado o cambiando el pH de la disolución de empapado, etc.

Alternativamente, se usa un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para examinar para seleccionar un anticuerpo con actividad de unión deseada. Los ensayos ELISA comprenden preparar un antígeno, recubrir los pocillos de una placa de microtitulación con el antígeno, eliminar mediante lavado el antígeno que no se unió a los pocillos, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa del rábano o fosfatasa alcalina) a los pocillos e incubar durante un periodo de tiempo, eliminar mediante lavado los anticuerpos no unidos o anticuerpos no unidos específicamente, y detectar la presencia de los anticuerpos unidos específicamente al antígeno que recubre el pocillo. En los ensayos ELISA, el anticuerpo de interés no necesita estar conjugado a un compuesto detectable; en vez de eso, puede añadirse al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce al anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable. Además, en vez de recubrir el pocillo con el antígeno, puede recubrirse el anticuerpo en el pocillo. En este caso, la molécula detectable puede ser el antígeno conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa del rábano o fosfatasa alcalina). Un experto en la técnica tendrá conocimientos en cuanto a los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de ensayos ELISA conocidas en la técnica. Para una discusión adicional referente a ensayos ELISA véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

Puede usarse un análisis cinético BIAcore para determinar las velocidades de asociación y disociación de la unión (Kd) de anticuerpos de la invención a un antígeno específico. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y la disociación de un antígeno de chips con anticuerpos inmovilizados sobre su superficie. Véase Wu *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.*, 294:151-162. En resumen, se inmoviliza proteína de fusión antígeno-Ig en un chip sensor CM5 activado por (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida) y N-hidroxi-succinimida mediante inyección de antígeno-Ig en acetato de sodio. Se inmoviliza el antígeno-Ig a una baja densidad para prevenir la nueva unión de Fab durante la fase de disociación. Para obtener la constante de la velocidad de asociación (Kon), se determina la velocidad de unión a seis concentraciones de Fab diferentes a una determinada velocidad de flujo. La constante de la velocidad de disociación (Koff) es el promedio de seis medidas obtenidas analizando la fase de disociación. Se analizan sensogramas con el programa BIAevaluation 3.0. Se calcula la Kd a partir de $Kd = Koff/Kon$. Se elimina el Fab residual tras cada medición mediante disociación prolongada. Preferiblemente, se escogen placas de lisis positivas, vuelven a sembrarse en placa a una densidad inferior y vuelven a examinarse.

La afinidad de unión de un anticuerpo (incluyendo un scFv u otra molécula que comprende, o alternativamente consiste en, fragmentos de anticuerpo o variantes del mismo) a un antígeno y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno pueden determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo, 3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo y las velocidades de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos mediante un análisis de gráfico de Scatchard. También puede determinarse la competición con un segundo anticuerpo usando radioinmunoensayos. En este caso, se incubaba un antígeno con un anticuerpo conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, 3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

También pueden usarse otros ensayos, tales como inmunoensayos, incluyendo, pero sin limitarse a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas tales como inmunotransferencia de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo sándwich, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación a complemento, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A, para examinar y caracterizar adicionalmente la especificidad de unión de un anticuerpo humanizado. Tales ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). A continuación se describen brevemente inmunoensayos a modo de ejemplo (que no se pretende que se interpreten a modo de limitación).

Preferiblemente, se usa un ensayo ELISA como examen secundario con sobrenadante preparado a partir de cultivo bacteriano que expresa fragmentos Fab con el fin de confirmar los clones identificados mediante el ensayo de hibridación de captura. Pueden llevarse a cabo dos ensayos ELISA: (1) Ensayo ELISA de cuantificación: esto puede llevarse a cabo esencialmente tal como se describe en Wu, 2003, *Methods Mol. Biol.*, 207, 197-212. En resumen, pueden determinarse las concentraciones mediante un ensayo ELISA con anticuerpo anti-Fab humano: se recubren pocillos individuales de una inmunoplaaca de Maxisorp de 96 pocillos con 50 ng de un anticuerpo de cabra anti-Fab humano y después se incuban con muestras (Fab expresados en sobrenadante) o patrón (Fab de IgG humana). Después sigue la incubación con un conjugado de anticuerpo de cabra anti-kappa humana con peroxidasa del

rábano (HRP). La actividad de HRP puede detectarse con un sustrato de TMB y la reacción puede extinguirse con H₂SO₄ 0,2 M. Se leen las placas a 450 nm. Entonces se seleccionan los clones que expresan una cantidad detectable de Fab para la siguiente parte del examen secundario. (2) Ensayo ELISA funcional: en resumen, se determina una actividad de unión a antígeno particular mediante el ensayo ELISA basado en antígeno: se recubren pocillos individuales de una inmunoplaaca de Maxisorp de 96 pocillos con 50 ng del antígeno de interés, se bloquean con BSA al 1%/Tween 20 al 0,1% y después se incuban con muestras (Fab expresados en sobrenadante). Después sigue la incubación con un conjugado de anticuerpo de cabra anti-kappa humana con peroxidasa del rábano (HRP). La actividad de HRP se detecta con un sustrato de TMB y la reacción se extingue con H₂SO₄ 0,2 M. Se leen las placas a 450 nm.

Generalmente los protocolos de inmunoprecipitación comprenden lisis de una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (NP-40 o Triton X- 100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0,1%, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, Trasylol al 1%) complementado con inhibidores de proteína fosfatasa y/o proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, 159 aprotinina, vanadato de sodio), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubarlo durante un periodo de tiempo (por ejemplo, hasta 4 horas) a 40°C, añadir perlas de Sepharose con proteína A y/o proteína G al lisado celular, incubarlo durante aproximadamente una hora o más a 40°C, lavar las perlas en tampón de lisis y volver a suspender las perlas en SDS/tampón de muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular puede evaluarse, por ejemplo, mediante análisis de inmunotransferencia tipo Western. Un experto en la técnica tendrá conocimientos en cuanto a los parámetros que pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el fondo (por ejemplo, aclarar previamente el lisado celular con perlas de Sepharose). Para una discusión adicional referente a protocolos de inmunoprecipitación véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en 10.16.1.

Generalmente el análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western comprende preparar muestras de proteína, someter a electroforesis las muestras de proteína en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, el 8%-20% de SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en disolución de bloqueo (por ejemplo, PBS con BSA al 3% o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-ser humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa del rábano o fosfatasa alcalina) o molécula radiactiva (por ejemplo, ¹²⁵I o ³²P) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la técnica tendrá conocimientos en cuanto a los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional referente a protocolos de inmunotransferencia de tipo Western véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1.

Un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo modificado (por ejemplo, humanizado) o fragmento del mismo con actividad de unión a antígeno deseada puede caracterizarse mediante secuenciación, tal como secuenciación de didesoxinucleótidos usando un analizador genómico ABI300. Pueden usarse otros inmunoensayos, tales como el examen mediante ensayo ELISA secundario en dos partes descrito anteriormente, para comparar los anticuerpos modificados (por ejemplo, humanizados) entre sí y con el anticuerpo donador en cuanto a la unión a un antígeno de interés particular.

2.8 Producción y caracterización de anticuerpos humanizados

Una vez seleccionados uno o más ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo con actividad de unión deseada, puede recuperarse el ácido nucleico mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica. Preferiblemente, se recuperan partículas de fago seleccionadas y se usan para infectar bacterias recientes antes de la recuperación de los ácidos nucleicos deseados.

Un fago que presenta una proteína que comprende una región variable humanizada con una especificidad o afinidad deseada puede eluirse de una matriz de afinidad mediante cualquier método conocido en la técnica. Puede usarse un ligando con mejor afinidad por la matriz. Puede usarse el anticuerpo no humanizado correspondiente. Puede usarse un método de elución que no es específico para el complejo antígeno-anticuerpo.

El método de elución leve usa la unión de la población de anticuerpos de fago a antígeno biotinilado y la unión a perlas magnéticas con estreptavidina. Tras el lavado para eliminar el fago no unido, se eluye el anticuerpo de fago y se usa para infectar células para proporcionar una población de anticuerpos de fago seleccionada. Un enlace disulfuro entre la biotina y la molécula de antígeno permite una elución suave con ditiotreitól. En una realización, puede usarse antígeno biotinilado en exceso, pero a, o por debajo de, una concentración equivalente a la constante de disociación deseada para la unión antígeno-anticuerpo. Este método es ventajoso para la selección de anticuerpos de alta afinidad (R. E. Hawkins, S. J. Russell y G. Winter J. Mol. Biol. 226 889-896, 1992). También pueden seleccionarse anticuerpos para tener velocidades de disociación más lentas para la selección de antígeno

tal como se describe en Hawkins *et al*, 1992, citado anteriormente. La concentración de antígeno biotinilado puede reducirse gradualmente para seleccionar anticuerpos de fago con afinidad superior. Como alternativa, el anticuerpo de fago puede estar en exceso con respecto al antígeno biotinilado con el fin de que los anticuerpos de fago compitan para la unión, de una manera análoga a la competición de fagos peptídicos por anticuerpo biotinilado descrita por J. K. Scott & G. P. Smith (Science 249 386-390, 1990).

En otra realización, puede introducirse una secuencia de nucleótidos que codifica para aminoácidos que constituyen un sitio de reconocimiento para la escisión mediante una proteasa sumamente específica entre el ácido nucleico foráneo insertado, por ejemplo, entre un ácido nucleico que codifica para un fragmento de anticuerpo, y la secuencia del resto del gen III. Ejemplos no limitativos de tales proteasas sumamente específicas son factor X y trombina. Tras la unión del fago a una matriz de afinidad y la elución para eliminar el fago no unido de manera específica y el fago unido de manera débil, el fago unido de manera fuerte se retirará mediante lavado de la columna con proteasa en condiciones adecuadas para la digestión en el sitio de escisión. Esto escindiría el fragmento de anticuerpo de la partícula de fago eluyendo el fago. Se esperará que este fago no sea eficaz, ya que el único sitio de proteasa debe ser el introducido específicamente. Entonces puede recuperarse el fago unido de manera fuerte infectando, por ejemplo, células TG I de *E. coli*.

Un procedimiento alternativo al anterior es tomar la matriz de afinidad que ha retenido el pAb unido de manera fuerte y extraer el ADN, por ejemplo sometiendo a ebullición en disolución de SDS. Entonces puede usarse el ADN extraído para transformar directamente células huésped *E. coli* o alternativamente pueden amplificarse las secuencias que codifican para anticuerpo, por ejemplo usando PCR con cebadores adecuados, y después insertarse en un vector para su expresión como anticuerpo soluble para un estudio adicional o un pAb para ciclos de selección adicionales.

Alternativamente, se une una población de fagos a una matriz de afinidad que contiene una baja cantidad de antígeno. Existe competición entre fagos, que presentan proteínas de alta afinidad y de baja afinidad, para la unión al antígeno en la matriz. El fago que presenta proteína de alta afinidad se une de manera preferente y la proteína de baja afinidad se elimina mediante lavado. Entonces se recupera la proteína de alta afinidad mediante elución con el ligando o mediante otros procedimientos que eluyen el fago de la matriz de afinidad (la publicación internacional n.º WO92/01047 demuestra este procedimiento).

El ácido nucleico recuperado que codifica para CDR donadoras y región de entramado humanizada puede usarse en sí mismo o puede usarse para construir ácido nucleico para una molécula de anticuerpo completa uniéndolos a la región constante del molde humano respectivo. Cuando se introducen los ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos en una línea de célula huésped adecuada, las células transfectadas pueden secretar anticuerpos con todas las características deseables de anticuerpos monoclonales.

Una vez obtenido un ácido nucleico que codifica para una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o fragmento del mismo (preferiblemente, que contiene la región variable de cadena pesada o ligera), puede producirse el vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, en el presente documento se describen métodos para preparar una proteína mediante expresión de un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo. Pueden usarse métodos que conocen bien los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican para anticuerpo y señales de control transcripcionales y de traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Los vectores replicables pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica para una molécula de anticuerpo de la invención, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, operativamente unida a un promotor. La expresión de una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, puede regularse mediante un promotor constitutivo. Alternativamente, la expresión de una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera se regula mediante un promotor inducible. La expresión de una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera puede regularse mediante un promotor específico de tejido. Tales vectores también pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 86/05807; la publicación internacional n.º WO 89/01036; y la patente estadounidense n.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en un vector de este tipo para la expresión de la totalidad de la cadena pesada, la totalidad de la cadena ligera o la totalidad de las cadenas tanto pesada como la ligera.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y entonces se cultivan las células transfectadas mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Por tanto, las células huésped pueden contener un polinucleótido que codifica para un anticuerpo o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o porción del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla, operativamente unido a un

promotor heterólogo. Preferiblemente, para la expresión de anticuerpos de cadena doble, pueden coexpresarse vectores que codifican para las cadenas tanto pesada como ligera en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, tal como se detalla a continuación.

5 Preferiblemente, la línea celular que se transforma para producir el anticuerpo alterado es una línea celular de mamífero inmortalizada de origen linfocítico, incluyendo, pero sin limitarse a, una línea celular de mieloma, hibridoma, trioma o cuadroma. La línea celular también puede comprender una célula linfocítica normal, tal como una célula B, que se ha inmortalizado mediante transformación con un virus, tal como el virus Epstein Barr. Lo más preferiblemente, la línea celular inmortalizada es una línea celular de mieloma o un derivado de la misma.

10 Se sabe que algunas líneas celulares linfocíticas inmortalizadas, tales como líneas celulares de mieloma, en su estado normal, secretan cadenas ligera o pesada de inmunoglobulina aisladas. Si se transforma una línea celular de este tipo con el ácido nucleico recuperado de la biblioteca de fagos, no será necesario reconstruir el fragmento recuperado con una región constante, siempre que la cadena normalmente secretada sea complementaria al dominio variable de la cadena de inmunoglobulina codificada por el ácido nucleico recuperado de la biblioteca de fagos.

Aunque la línea celular usada es preferiblemente una línea celular de mamífero, alternativamente puede usarse cualquier otra línea celular adecuada. Estas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión recombinantes de ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias que codifican para anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican para anticuerpo; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias que codifican para anticuerpo; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican para anticuerpo; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). Preferiblemente, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento principal del gen de promotor intermedio/temprano de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, 1986, Gene 45:101; y Cockett *et al.*, 1990, Bio/Technology 8:2).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula de anticuerpo que está expresándose. Por ejemplo, cuando debe producirse una gran cantidad de tal proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan al, vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO 12:1791), en el que la secuencia que codifica para anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región que codifica para lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; y vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509). También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células sometidas a lisis mediante adsorción y unión a perlas de glutatión agarosa en matriz seguido por la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de trombina o factor Xa proteasa de modo que la diana clonada puede liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica para anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de poliedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de poliedrina).

En células huésped de mamífero, pueden usarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia que codifica para anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartito. Entonces puede insertarse este gen quimérico en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y que puede expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para una traducción eficaz de secuencias que codifican para anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar

la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de la traducción y codones de iniciación exógenos pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. apropiados (véase, por ejemplo, Bittner *et al.*, 1987, *Methods in Enzymol.* 153:516-544).

5 Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el ácido nucleico de una manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y
10 la modificación postraduccional de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea expresada. Para ello, pueden usarse células huésped eucariotas que presentan la maquinaria celular para un procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W 138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murina que no produce endógenamente ninguna
15 cadena de inmunoglobulina), CRL7O3O y HsS78Bst.

Para la producción a largo plazo, con alto rendimiento, de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse por ingeniería líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, pueden transformarse células huésped con ADN controlado mediante elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, puede dejarse que las células diseñadas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en unos medios enriquecidos y después se cambian a unos medios selectivos.
20 El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse para dar líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar por ingeniería líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Tales líneas celulares diseñadas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en la selección y la evaluación de composiciones que interaccionan directa o
25 indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, los genes de timidina cinasa de virus del herpes simple (Wigler *et al.*, 1977, *Cell* 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, *Cell* 22:8-17) que pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos como base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, *Natl. Acad. Sci. USA* 77: 357; O'Hare *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527); *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; mayo de 1993, *TIB TECH* 11(5):155-2 15); e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, 1984, *Gene* 30:147). Pueden aplicarse de manera rutinaria métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación con vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, aumentar el nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse *et al.*, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión, codificando el primer vector para un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector para un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica para, y que puede expresar, polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; y Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2 197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

65 Los anticuerpos también pueden introducirse en un animal transgénico (por ejemplo, ratón transgénico). Véanse, por

ejemplo, Bruggemann, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 49(3):203-8 (2001); Bruggemann y Neuberger, Immunol. Today 8:391-7 (1996), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia. Pueden obtenerse constructos transgénicos o transloci, por ejemplo, mediante ensamblaje de plásmidos, clonación en cromosomas artificiales de levadura y el uso de fragmentos de cromosomas. La integración y el mantenimiento de translocus en cepas de animales transgénicos pueden lograrse mediante inyección de ADN pronuclear en ovocitos y diversos métodos de transfección usando células madre embrionarias.

Por ejemplo, pueden introducirse al azar, o mediante recombinación homóloga, ácidos nucleicos que codifican para cadena pesada y/o ligera humanizada o regiones variables de cadena pesada y/o ligera humanizada en células madre embrionarias de ratón. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos humanizados mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región JH evita la producción de anticuerpo endógeno. Se expanden las células madre embrionarias modificadas y se microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Entonces se crían los ratones quiméricos para producir crías homocigotas que expresan anticuerpos humanizados.

Una vez producida una molécula de anticuerpo mediante expresión recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad por el antígeno específico tras proteína A, y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptido heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

2.9 Conjugados de anticuerpos

Pueden conjugarse o fusionarse anticuerpos o fragmentos de los mismos con uno o más restos, incluyendo, pero sin limitarse a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento del mismo, preferiblemente con un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. No se necesita necesariamente que la fusión sea directa, sino que puede producirse mediante secuencias de ligador. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos para dirigir polipéptidos heterólogos a tipos de células particulares, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, fusionando o conjugando los anticuerpos con anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particulares. También pueden usarse anticuerpos fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 93/21232; patente europea n.º EP 439.095; Naramura *et al.*, 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; patente estadounidense n.º 5.474.981; Gillies *et al.*, 1992, PNAS 89: 1428-1432; y Fell *et al.*, 1991, J. Immunol. 146:2446-2452.

Las composiciones pueden comprender proteínas, péptidos o polipéptidos heterólogos fusionados o conjugados con fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos pueden fusionarse o conjugarse con un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂, un dominio V_H, un dominio V_L, una CDR de V_H, una CDR de V_L o fragmento de los mismos. En la técnica se conocen bien métodos para fusionar o conjugar polipéptidos con porciones de anticuerpo. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; las patentes europeas n.ºs EP 307.434 y EP 367.166; las publicaciones internacionales n.ºs WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de intercambio génico, intercambio de motivos, intercambio de exones y/o intercambio codones (denominadas colectivamente "intercambio de ADN"). El intercambio de ADN puede emplearse para alterar las actividades de anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades superiores y velocidades de disociación inferiores). Véanse, generalmente, las patentes estadounidenses n.ºs 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten *et al.*, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2): 76-82; Hansson, *et al.*, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313. Pueden alterarse anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, sometiéndolos a mutagénesis al azar mediante PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos al azar u otros métodos antes de la recombinación. Pueden recombinarse una o más porciones de un polinucleótido que codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

- Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otras, muchas de las cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, por ejemplo, hexa-histidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, 1984, Cell 37:767) y la etiqueta "FLAG".
- En otras realizaciones, pueden conjugarse anticuerpos o fragmentos, análogos o derivados de los mismos con un agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el desarrollo o la progresión de un trastorno como parte de un procedimiento de ensayos clínicos, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Tal diagnóstico y detección puede lograrse acoplado el anticuerpo a sustancias detectables incluyendo, pero sin limitarse a, diversas enzimas, tales como, pero sin limitarse a, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero sin limitarse a, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{71}Se , ^{113}Sn y $^{117}\text{estaño}$; metales emisores de positrones que usan diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radiactivos y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos.
- Pueden conjugarse anticuerpos o fragmentos de los mismos con un resto terapéutico. Puede conjugarse un anticuerpo o fragmento del mismo con un resto terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocídico, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para células. Los restos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cisdiclorodiaminaplato (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), moléculas de auristatina (por ejemplo, auristatina PHE, briostatina 1 y solastatina 10; véase Woyke *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8 (2002), Woyke *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 45:3580-4 (2001), Mohammad *et al.*, Anticancer Drugs 12:735-40 (2001), Wall *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:76-80 (1999), Mohammad *et al.*, Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999)), hormonas (por ejemplo, glucocorticoides, progestinas, andrógenos y estrógenos), inhibidores de enzimas reparadoras del ADN (por ejemplo, etopósido o topotecán), inhibidores de cinasas (por ejemplo, compuesto ST1571, mesilato de imatinib (Kantarjian *et al.*, Clin Cancer Res. 8(7):2167-76 (2002)), agentes citotóxicos (por ejemplo, paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrottestosterona, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos) y los compuestos dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs. 6.245.759, 6.399.633, 6.383.790, 6.335.156, 6.271.242, 6.242.196, 6.218.410, 6.218.372, 6.057.300, 6.034.053, 5.985.877, 5.958.769, 5.925.376, 5.922.844, 5.911.995, 5.872.223, 5.863.904, 5.840.745, 5.728.868, 5.648.239, 5.587.459), inhibidores de farnesilo transferasa (por ejemplo, R115777, BMS-214662 y los dados a conocer, por ejemplo, por las patentes estadounidenses n.ºs. 6.458.935, 6.451.812, 6.440.974, 6.436.960, 6.432.959, 6.420.387, 6.414.145, 6.410.541, 6.410.539, 6.403.581, 6.399.615, 6.387.905, 6.372.747, 6.369.034, 6.362.188, 6.342.765, 6.342.487, 6.300.501, 6.268.363, 6.265.422, 6.248.756, 6.239.140, 6.232.338, 6.228.865, 6.228.856, 6.225.322, 6.218.406.6.211.193, 6.187.786, 6.169.096, 6.159.984, 6.143.766, 6.133.303, 6.127.366, 6.124.465, 6.124.295, 6.103.723, 6.093.737, 6.090.948, 6.080.870, 6.077.853, 6.071.935, 6.066.738, 6.063.930, 6.054.466, 6.051.582, 6.051.574 y 6.040.305), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina; irinotecán; SN-38; topotecán; 9-aminocamptotecina; GG-211 (GI 147211); DX-8951f; IST-622; rubitecán; pirazoloacridina; XR-5000; saintopina; UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN-1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; y rebecamicina); bulgareína; compuestos de unión al surco menor del ADN tales como colorante Hoechst 33342 y colorante Hoechst 33258; nitidina; fagaronina; epiberberina; coralina; beta-lapacona; BC-4-1; bisfosfonatos (por ejemplo, alendronato, cimadronato, clodronato, tiludronato, etidronato, ibandronato, neridronato, olpandronato, risedronato, piridronato, pamidronato, zolendronato), inhibidores de HMG-CoA reductasa (por ejemplo, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, estatina, cerivastatina, Lescol, Lupitor, rosuvastatina y atorvastatina) y sales, solvatos, clatrato y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Véanse, por ejemplo, Rothenberg, M.L., Annals of Oncology 8:837-855(1997); y Moreau, P., *et al.*, J. Med. Chem. 41:1631-1640(1998)), oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, los dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs. 6.277.832, 5.998.596, 5.885.834, 5.734.033 y 5.618.709), inmunomoduladores (por ejemplo, anticuerpos y citocinas), anticuerpos e inhibidores de adenosina desaminasa (por

ejemplo, fosfato de fludarabina y 2-clordesoxiadenosina).

Además, puede conjugarse un anticuerpo o fragmento del mismo con un resto terapéutico o resto farmacológico que modifica una respuesta biológica dada. No debe interpretarse que los restos terapéuticos o restos farmacológicos estén limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que presenta una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I (véase la publicación internacional n.º WO 97/33899), AIM II (véase la publicación internacional n.º WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi *et al.*, 1994, J. Immunol., 6:1567-1574) y VEGF (véase la publicación internacional n.º WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina, endostatina o un componente de la ruta de coagulación (por ejemplo, factor tisular); o, un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una lincocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF")), un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")) o un agente de coagulación (por ejemplo, calcio, vitamina K, factores tisulares, tales como, pero sin limitarse a, factor de Hageman (factor XII), quininógeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína (PK), proteínas-factores de coagulación II (protrombina), factor V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, fosfolípido, fibrinopéptidos A y B de las cadenas α y β de fibrinógeno, monómero de fibrina).

Además, puede conjugarse un anticuerpo con restos terapéuticos tales como un ión metálico radiactivo, tal como emisores alfa tales como ^{213}Bi o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones metálicos radiactivos, incluyendo, pero sin limitarse a, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , con polipéptidos. En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N"-tetraacético (DOTA) que puede fijarse al anticuerpo por medio de una molécula ligadora. Tales moléculas ligadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; y Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50.

Se conocen técnicas para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos, véanse, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

Alternativamente, puede conjugarse un anticuerpo con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos tal como se describe por Segal en la patente estadounidense n.º 4.676.980, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

El fármaco o resto terapéutico conjugado con un anticuerpo o fragmento del mismo debe elegirse para lograr el/los efecto(s) terapéutico(s) o profiláctico(s) deseado(s) para un trastorno particular en un sujeto. Un médico u otro personal médico debe tener en cuenta lo siguiente cuando decida qué fármaco o resto terapéutico conjugar con un anticuerpo o fragmento del mismo: la naturaleza de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y el estado del sujeto.

También pueden fijarse anticuerpos a soportes sólidos, lo cual es particularmente útil para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

2.10 Usos de los anticuerpos de la invención

La presente invención proporciona métodos de humanización eficaz de un anticuerpo de interés. Los anticuerpos humanizados obtenidos mediante un método de la presente invención pueden usarse solos o en combinación con otros agentes profilácticos o terapéuticos para tratar, gestionar, prevenir o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

Los métodos para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno pueden comprender administrar a un sujeto que lo necesita uno o más anticuerpos solos o en combinación con una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo obtenido mediante un método de la invención. Las composiciones pueden comprender uno o más anticuerpos y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de anticuerpos obtenidos mediante un método de la invención y métodos de prevención, gestión, tratamiento o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo usando dichas composiciones. Los agentes terapéuticos o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos, polipéptidos,

proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos de ADN y ARN incluyendo, pero sin limitarse a, secuencias de nucleótidos antisentido, hélices triples, iARN y secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos), anticuerpos, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales.

5
 10
 15
 20
 25
 30

Cualquier terapia que se sabe que es útil o que se ha usado o está usándose actualmente para la prevención, gestión, tratamiento o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo puede usarse en combinación con un anticuerpo obtenido mediante un método de la invención tal como se describe en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Gilman *et al.*, Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10^a ed., McGraw-Hill, Nueva York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M.D. *et al.* (eds.), 17^a Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20^a Ed., Bennett y Plum (eds.), W.B. Saunders, Filadelfia, 1996 para información referente a terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que se han usado o están usándose actualmente para prevenir, tratar, gestionar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, adrenocorticoides, corticosteroides (por ejemplo, beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, diclofenac e inhibidores de COX-2), analgésicos, antagonistas de leucotrieno (por ejemplo, montelukast, metil-xantinas, zafirlukast y zileutón), agonistas beta2 (por ejemplo, albuterol, biterol, fenoterol, isetarina, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, terbutalina-formoterol, salmeterol y salbutamol-terbutalina), agentes anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio y bromuro de oxitropio), sulfasalazina, penicilamina, dapsona, antihistamínicos, agentes contra la malaria (por ejemplo, hidroxicloquina), agentes antivirales y antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, eritromicina, penicilina, mitramicina y antramicina (AMC)).

Los anticuerpos humanizados obtenidos mediante un método de la invención pueden usarse directamente contra un antígeno particular. Los anticuerpos obtenidos mediante un método de la invención pueden pertenecer a una subclase o isotipo que puede mediar en la lisis de células a las que se une el anticuerpo. Los anticuerpos obtenidos mediante un método de la invención pueden pertenecer a una subclase o isotipo que, tras complejarse con proteínas de superficie celular, activa el complemento del suero y/o media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) activando células efectoras tales como linfocitos citolíticos naturales o macrófagos.

35
 40

Se sabe que las actividades biológicas de anticuerpos están determinadas, en gran medida, por los dominios constantes o la región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananue y Benacerraf, Textbook of Immunology, 2^a edición, Williams & Wilkins, pág. 218 (1984)). Esto incluye su capacidad para activar el complemento y para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) tal como realizan los leucocitos. Anticuerpos de diferentes clases y subclases se diferencian en este aspecto, al igual que lo hacen los anticuerpos de la misma subclase pero diferente especie; según la presente invención, se preparan anticuerpos de las clases que tienen la actividad biológica deseada. La preparación de estos anticuerpos implica la selección de dominios constantes de anticuerpo y su incorporación en el anticuerpo humanizado mediante una técnica conocida. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de ratón de la clase IgG₃ e IgG_{2a} pueden activar el complemento del suero tras la unión a las células diana que expresan el antígeno análogo, y por tanto los anticuerpos humanizados que incorporan funciones efectoras de IgG₃ e IgG_{2a} son deseables para determinadas aplicaciones terapéuticas.

45
 50

En general, los anticuerpos de ratón de la subclase de IgG_{2a} e IgG₃ y ocasionalmente IgG₁ pueden mediar en la ADCC, y los anticuerpos de las subclases IgG₃, IgG_{2a} e IgM se unen y activan el complemento del suero. La activación del complemento requiere generalmente la unión de al menos dos moléculas de IgG en estrecha proximidad en la célula diana. Sin embargo, la unión de sólo una molécula de IgM activa el complemento del suero.

55

Puede someterse a ensayo la capacidad de cualquier anticuerpo particular para mediar en la lisis de la célula diana mediante activación del complemento y/o ADCC. Se hacen crecer las células de interés y se marcan *in vitro*; se añade el anticuerpo al cultivo celular en combinación o bien con complemento del suero o bien con células inmunitarias que pueden activarse mediante los complejos de antígeno-anticuerpo. Se detecta la citólisis de las células diana mediante la liberación del marcador de las células lisadas. De hecho, pueden examinarse anticuerpos usando el suero del propio paciente como fuente de complemento y/o células inmunitarias. Entonces puede usarse terapéuticamente en ese paciente particular el anticuerpo que puede activar el complemento o mediar en la ADCC en la prueba *in vitro*.

60

Puede preferirse el uso de anticuerpos de IgM para determinadas aplicaciones, sin embargo puede que las moléculas de IgG, al ser más pequeñas, puedan localizar determinados tipos de células infectadas mejor que las moléculas de IgM.

65

En algunas realizaciones, los anticuerpos obtenidos mediante un método de esta invención son útiles en la inmunización pasiva de pacientes.

También pueden usarse los anticuerpos obtenidos mediante un método de la invención en ensayos de diagnóstico o

bien *in vivo* o bien *in vitro* para la detección/identificación de la expresión de un antígeno en un sujeto o una muestra biológica (por ejemplo, células o tejidos). Se facilitan ejemplos no limitativos de uso de un anticuerpo, un fragmento del mismo o una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo en un ensayo de diagnóstico en las patentes estadounidenses n.^{os} 6.392.020; 6.156.498; 6.136.526; 6.048.528; 6.015.555; 5.833.988; 5.811.310; 5 8 5.652.114; 5.604.126; 5.484.704; 5.346.687; 5.318.892; 5.273.743; 5.182.107; 5.122.447; 5.080.883; 5.057.313; 4.910.133; 4.816.402; 4.742.000; 4.724.213; 4.724.212; 4.624.846; 4.623.627; 4.618.486; 4.176.174. Los ensayos de diagnóstico adecuados para el antígeno y sus anticuerpos dependen del anticuerpo particular usado. Ejemplos no limitativos son ensayo ELISA, ensayo de tipo sándwich y ensayos de inhibición estérica. Para ensayos de diagnóstico *in vivo*, pueden conjugarse los anticuerpos con un marcador que puede detectarse mediante técnicas de obtención de imágenes, tales como rayos X, tomografía axial computerizada (TAC), ecografía u obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM). Los anticuerpos también pueden usarse para la purificación por afinidad del antígeno a partir de cultivo de células recombinantes u otras fuentes naturales.

2.11 Administración y formulaciones

Las composiciones que comprenden anticuerpos obtenidos mediante un método de la invención son adecuadas para su uso en el diagnóstico, detección o monitorización de un trastorno, en la prevención, tratamiento, gestión o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo y/o en investigación. Una composición puede comprender uno o más anticuerpos obtenidos mediante un método de la invención. Una composición puede comprender uno o más anticuerpos obtenidos mediante un método de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de tales anticuerpos. Preferiblemente, se sabe que los agentes profilácticos o terapéuticos son útiles para, o se han usado o están usándose actualmente en la prevención, tratamiento, gestión o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. Según estas realizaciones, la composición puede comprender además un portador, diluyente o excipiente.

Las composiciones incluyen, pero no se limitan a, composiciones de fármacos a granel útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas farmacéuticas unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico dado a conocer en el presente documento o una combinación de esos agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones son composiciones farmacéuticas y comprenden una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención, un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, una cantidad eficaz de otro agente profiláctico o terapéutico.

La composición farmacéutica puede formularse como una forma farmacéutica oral o no oral, para liberación inmediata o prolongada. La composición puede comprender componentes inactivos habitualmente usados en la preparación farmacéutica tales como diluyentes, cargas, disgregantes, edulcorantes, lubricantes y aromatizantes. La composición farmacéutica se formula preferiblemente para su administración intravenosa, o bien mediante inyección en bolo o bien mediante goteo sostenido, o para liberación a partir de una cápsula implantada. Una formulación típica para administración intravenosa usa solución salina fisiológica como diluyente.

También pueden usarse porciones Fab o Fab' de los anticuerpos producidos mediante un método de la invención como principio activo terapéutico. La preparación de estos fragmentos de anticuerpo se conoce bien en la técnica.

La composición también puede incluir material impreso que describe las indicaciones clínicas para las que pueden administrarse los anticuerpos como agente terapéutico, calendarios y cantidades de dosificación y/o contraindicaciones para la administración de los anticuerpos a un paciente.

Las composiciones incluyen, pero no se limitan a, composiciones de fármaco a granel útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas farmacéuticas unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico dado a conocer en el presente documento o una combinación de esos agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones son composiciones farmacéuticas y comprenden una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos, un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, una cantidad eficaz de otro agente profiláctico o terapéutico.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o indicada en la farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto)), excipiente o vehículo en el que está contenido o con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral o aceite de sésamo. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y disoluciones

acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche en polvo desnatada, glicerol, propileno, glicol, agua o etanol. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos o formulaciones de liberación sostenida.

Generalmente, los componentes de composiciones de la invención o bien se suministran por separado o bien se mezclan juntos en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición debe administrarse por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de solución salina o agua estéril para inyección de modo que pueden mezclarse los componentes antes de la administración.

Las composiciones pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar uno o más anticuerpos o la combinación de uno o más anticuerpos y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). Además, puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de formación de aerosol. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las publicaciones PCT n.^{os} WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. Un anticuerpo de la invención, terapia de combinación o una composición de la invención se administran usando la tecnología de administración pulmonar de fármacos Alquerms AIR™ (Alquerms, Inc., Cambridge, MA). Se administran agentes profilácticos o terapéuticos por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos por vía local a la zona que necesita el tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialísticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®) o matrices de colágeno. Se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos por vía local a la zona afectada a un sujeto para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos por vía local a la zona afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintas de un anticuerpo a un sujeto para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

El agente profiláctico o terapéutico puede administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una realización, puede usarse una bomba para lograr la liberación controlada o sostenida (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). Pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias (véanse por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véanse también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105); patente estadounidense n.^o 5.679.377; patente estadounidense n.^o 5.916.597; patente estadounidense n.^o 5.912.015; patente estadounidense n.^o 5.989.463; patente estadounidense n.^o 5.128.326; publicación PCT n.^o WO 99/15154; y publicación PCT n.^o WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico),

5 poliacrilamida, polietilenglicol, polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. El polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está libre de impurezas lixiviables, es estable en almacenamiento, estéril y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida puede situarse en proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así tan sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

10 Se comentan sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.526.938, publicación PCT WO 91/05548, publicación PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, y Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760.

20 Cuando la composición es un ácido nucleico que codifica para un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelve intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente estadounidense n.º 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en unión con un péptido de tipo caja homeótica que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de célula huésped para su expresión mediante recombinación homóloga.

30 Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosa y rectal. La composición se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

40 Si las composiciones deben administrarse por vía tópica, las composiciones pueden formularse en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, disolución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, PA (1995). Para formas farmacéuticas tópicas no pulverizables, normalmente se emplean formas de viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente superior a la del agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, disoluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos o ungüentos, que, si se desea, están esterilizadas o mezcladas con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones o sales) para influir sobre diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas farmacéuticas tópicas adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el principio activo, preferiblemente en combinación con un portador inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como Freon) o en un frasco exprimible. También pueden añadirse agentes de humectación o humectantes a composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas si se desea. En la técnica se conocen bien ejemplos de tales componentes adicionales.

55 Si el método comprende la administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en forma de aerosol, pulverización, niebla o en forma de gotas. En particular, pueden administrarse convenientemente agentes profilácticos o terapéuticos en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

65 Si el método comprende la administración oral, pueden formularse composiciones por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, cachets, cápsulas de gelatina, disoluciones o suspensiones. Pueden prepararse

comprimidos o cápsulas mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, pero sin limitarse a, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse de manera adecuada para una liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de un(os) agente(s) profiláctico(s) o terapéutico(s).

El método puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente de formación de aerosol. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las publicaciones PCT n.ºs WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Un anticuerpo, terapia de combinación y/o composición puede administrarse usando la tecnología de administración pulmonar de fármacos Alquermes AIR™ (Alquermes, Inc., Cambridge, MA).

El método puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Pueden presentarse formulaciones para inyección en forma farmacéutica unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de su uso.

Los métodos pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de larga duración pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (por ejemplo, como una sal moderadamente soluble).

Los métodos abarcan administración de composiciones formuladas como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los componentes de composiciones se suministran o bien por separado o bien mezclados entre sí en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es infusión, la composición puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando el modo de administración es mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de solución salina o agua para inyección estéril de modo que los componentes pueden mezclarse antes de la administración.

Uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas, pueden envasarse en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad del agente. Uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas, pueden suministrarse como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y pueden reconstituirse (por ejemplo, con agua o solución salina) hasta la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferiblemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas deben almacenarse a entre 2°C y 8°C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas, deben administrarse en el plazo de 1 semana, preferiblemente en el plazo de 5 días, en el plazo de 72 horas, en el plazo de 48 horas, en el plazo de 24 horas, en el plazo de 12 horas, en el plazo de 6 horas, en el plazo de 5 horas, en el plazo de 3 horas o en el

plazo de 1 hora tras haberse reconstituido. Alternativamente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas se suministra en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del agente. Preferiblemente, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado de al menos 0,25 mg/ml, más preferiblemente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse a entre 2°C y 8°C en su recipiente original.

Generalmente, los componentes de las composiciones se derivan de un sujeto que tiene el mismo origen de especie o reactividad de especie que el receptor de tales composiciones. Por tanto, se administran anticuerpos humanos o humanizados a un paciente humano para la terapia o profilaxis.

2.11.1 Terapia génica

Se administran secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para un anticuerpo u otro agente profiláctico o terapéutico para tratar, prevenir, gestionar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo a modo de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta terapia, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo o agente profiláctico o terapéutico codificado que media en un efecto profiláctico o terapéutico.

Puede usarse cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; mayo de 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Se describen métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

El método comprende la administración de una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos u otro agente profiláctico o terapéutico, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo, otro agente profiláctico o terapéutico, o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesada o ligera del mismo en un huésped adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, operativamente unidos a la región que codifica para anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. Pueden usarse moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de un anticuerpo u otro agente profiláctico o terapéutico y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican para anticuerpo (Koller y Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, 1989, *Nature* 342:435-438). El anticuerpo expresado u otro agente profiláctico o terapéutico puede ser un anticuerpo de cadena sencilla; alternativamente, las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias que codifican para las cadenas tanto pesada como ligera, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo u otro agente profiláctico o terapéutico.

La administración de los ácidos nucleicos a un sujeto puede ser o bien directa, en cuyo caso se expone el sujeto directamente al ácido nucleico o a vectores que portan ácido nucleico, o bien indirecta, en cuyo caso en primer lugar se transforman células con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se trasplantan en el sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

Las secuencias de ácido nucleico pueden administrarse directamente *in vivo*, en el que se expresan para producir el producto codificado. Esto puede lograrse mediante cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolas como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante infección usando vectores retrovirales defectuosos o atenuados u otros vectores virales (véase la patente estadounidense n.º 4.980.286), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolo unido a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolo unido a un ligando propenso a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432) (que puede usarse para seleccionar como diana tipos de células que expresan específicamente los receptores). Alternativamente, pueden formarse complejos ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. Aún adicionalmente, puede dirigirse el ácido nucleico *in vivo* para la captación y expresión específica de células, seleccionando como diana un receptor específico (véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.ºs WO 92/06180; WO 92/22635; W092/20316; W093/14188; y WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; y Zijlstra *et al.*, 1989, *Nature* 342:435-438).

Pueden usarse vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican para un anticuerpo, otro agente profiláctico o terapéutico, o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase Miller *et al.*, 1993, *Met. Enzymol.* 217:581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral e la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo u otro agente profiláctico o terapéutico que van a usarse en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la administración del gen al interior de un sujeto. Pueden encontrarse más detalles sobre vectores retrovirales en Boesen *et al.*, 1994, *Biotherapy* 6:291-302, que describe el uso de un vector retroviral para suministrar el gen *mdr1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Klein *et al.*, 1994, *Blood* 83:1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4:129-141; y Grossman y Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de manera natural los epitelios respiratorios en los que provocan una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de poder infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, 1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.*, 1994, *Human Gene Therapy* 5:3-10 demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos Rhesus. Pueden encontrarse otros casos del uso de adenovirus en terapia génica en Rosenfeld *et al.*, 1991, *Science* 252:431-434; Rosenfeld *et al.*, 1992, *Cell* 68:143-155; Mastrangeli *et al.*, 1993, *J. Clin. Invest.* 91:225-234; publicación PCT W094/12649; y Wang *et al.*, 1995, *Gene Therapy* 2:775-783. También se ha propuesto el virus adenoasociado (AAV) para su uso en terapia génica (Walsh *et al.*, 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204: 289-300; y patente estadounidense n.º 5.436.146).

Otro enfoque a la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Entonces se someten las células a selección para aislar las células que han captado y están expresando el gen transferido. Entonces se administran esas células a un sujeto.

En este método, se introduce el ácido nucleico en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o de bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células (véanse, por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993, *Met. Enzymol.* 217:599-618; Cohen *et al.*, 1993, *Met. Enzymol.* 217:618-644; *Clin. Pharma. Ther.* 29:69-92 (1985)) y pueden usarse, siempre que no se alteren las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que pueda expresarse el ácido nucleico por la célula y preferiblemente pueda heredarse y expresarse por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células considerada para su uso depende de varios factores incluyendo, pero sin limitarse a, los efectos deseados y el estado del paciente, y puede determinarse por un experto en la técnica.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para fines de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula deseado, disponible, e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas (por ejemplo, tal como se obtienen de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.). Preferiblemente, la célula usada para terapia génica es autóloga para el sujeto.

Cuando se usan células recombinantes en terapia génica, pueden introducirse secuencias de ácido nucleico que codifican para un anticuerpo o fragmento del mismo en las células de tal manera que pueden expresarse por las células o su progenie, y entonces se administran las células recombinantes *in vivo* para obtener el efecto terapéutico. Pueden usarse células madre o progenitoras. Potencialmente puede usarse cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* (véanse por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, *Cell* 7 1:973-985; Rheinwald, 1980, *Met. Cell Bio.* 21A:229; y Pittelkow y Scott, 1986, *Mayo Clinic Proc.* 61:771).

El ácido nucleico que va a introducirse con fines de terapia génica comprende un promotor inducible operativamente unido a la región codificante, de tal manera que puede controlarse la expresión del ácido nucleico controlando la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

5

2.12 Dosificación y frecuencia de administración

La cantidad de un agente profiláctico o terapéutico o una composición que será eficaz en el tratamiento, gestión, prevención o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo puede determinarse mediante métodos clínicos convencionales. La frecuencia y dosificación variarán según factores específicos para cada paciente dependiendo de la terapia o terapias específicas (por ejemplo, el agente o los agentes terapéuticos o profilácticos específicos) administradas, la gravedad del trastorno, enfermedad o estado, la vía de administración, así como la edad, peso corporal, respuesta, el estado inmunitario del paciente y la historia clínica anterior del paciente. Por ejemplo, la dosificación de un agente profiláctico o terapéutico o una composición que será eficaz en el tratamiento, prevención, gestión o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo puede determinarse administrando la composición a un modelo animal tal como, por ejemplo, los modelos animales dados a conocer en el presente documento o conocidos por los expertos en la técnica. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. Un experto en la técnica puede seleccionar regímenes adecuados considerando tales factores y siguiendo, por ejemplo, dosificaciones notificadas en la bibliografía y recomendadas en el Physician's Desk Reference (57ª ed., 2003).

La toxicidad y/o eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren terapias que muestran grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse terapias que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no infectadas y así reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración usada. Para cualquier terapia usada, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Para péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos, la dosificación administrada a un paciente es normalmente de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferiblemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos y humanizados tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria frente a los polipéptidos foráneos. Por tanto, con frecuencia son posibles dosificaciones menores de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente.

Las dosis a modo de ejemplo de una molécula pequeña incluyen cantidades de miligramos o microgramos de la molécula pequeña por kilogramo de sujeto o peso de muestra (por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo o de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo).

Las dosificaciones de agentes profilácticos o terapéuticos se describen en el Physicians' Desk Reference (56ª ed., 2002).

2.13 Ensayos biológicos

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos producidos mediante métodos de la presente invención pueden caracterizarse de una variedad de maneras bien conocidas por un experto en la técnica. En particular, pueden caracterizarse a ensayo tales anticuerpos o fragmentos de los mismos para determinar la capacidad para unirse inmunoespecíficamente a un antígeno. Un ensayo de este tipo puede realizarse en disolución (por ejemplo, Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), con perlas (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), con chips (Fodor, 1993,

Nature 364:555 556), con bacterias (patente estadounidense n.º 5.223.409), con esporas (patentes estadounidenses n.ºs 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), con plásmidos (Cull *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865 1869) o con fagos (Scott y Smith, 1990, Science 249:386 390; Cwirla *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378 6382; y Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301 310). Entonces pueden someterse a ensayo los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se han identificado para determinar su especificidad y afinidad.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden someterse a ensayo para determinar la unión inespecífica a un antígeno específico y la reactividad cruzada con otros antígenos mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inespecífica y la reactividad cruzada incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como inmunotransferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ensayo ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación a complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes o inmunoensayos de proteína A. Tales ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Se describen brevemente inmunoensayos a modo de ejemplo en la sección 5.6.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos también pueden someterse a ensayo para determinar su capacidad para inhibir la unión de un antígeno a su receptor de célula huésped usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden ponerse en contacto células que expresan un receptor con un ligando para ese receptor en presencia o ausencia de un anticuerpo o fragmento del mismo que es un antagonista del ligando y puede medirse la capacidad del anticuerpo o fragmento del mismo para inhibir la unión del ligando, por ejemplo, mediante citometría de flujo o un ensayo de centelleo. Pueden marcarse el ligando o el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con un compuesto detectable tal como un marcador radiactivo (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S y ^{125}I) o un marcador fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre el ligando y su receptor. Alternativamente, la capacidad de anticuerpos o fragmentos de los mismos para inhibir que un ligando se una a su receptor puede determinarse en ensayos libres de célula. Por ejemplo, puede ponerse en contacto un ligando con un anticuerpo o fragmento del mismo que es un antagonista del ligando y puede determinarse la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para inhibir que el ligando se una a su receptor. Preferiblemente, se inmoviliza el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo que es un antagonista del ligando sobre un soporte sólido y se marca el ligando con un compuesto detectable. Alternativamente, se inmoviliza el ligando sobre un soporte sólido y se marca el anticuerpo o fragmento del mismo con un compuesto detectable. Un ligando puede estar parcial o completamente purificado (por ejemplo, parcial o completamente libre de otros polipéptidos) o ser parte de un lisado celular. Alternativamente, puede biotinizarse un ligando usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, kit de biotilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL).

Un anticuerpo o un fragmento del mismo construido y/o identificado según la presente invención puede someterse a prueba *in vitro* y/o *in vivo* para determinar su capacidad para modular la actividad biológica de células. Tal capacidad puede evaluarse, por ejemplo, detectando la expresión de antígenos y genes; detectando la proliferación de células; detectando la activación de moléculas de señalización (por ejemplo, factores de transducción de señales y cinasas); detectando la función efectora de células; o detectando la diferenciación de células. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica para medir estas actividades. Por ejemplo, puede someterse a ensayo la proliferación celular mediante ensayos de incorporación de ^3H -timidina y recuentos celulares con azul trípiano. Puede someterse a ensayo la expresión de antígenos, por ejemplo, mediante inmunoensayos incluyendo, pero sin limitarse a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como inmunotransferencias de tipo Western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ensayo ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación a complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y análisis FACS. La activación de moléculas de señalización puede someterse a ensayo, por ejemplo, mediante ensayos de cinasas y ensayos de desplazamiento electroforético (EMSA).

Preferiblemente, los anticuerpos, fragmentos de los mismos o composiciones se someten a prueba *in vitro* y después *in vivo* para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica es indicada incluyen ensayos de cultivo celular en los que se hace crecer una muestra tisular de un paciente en cultivo y se expone a, o se pone de otro modo en contacto con, una composición farmacéutica, y se observa el efecto de tal composición sobre la muestra tisular. La muestra tisular puede obtenerse mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la terapia terapéuticamente más eficaz (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) para cada paciente individual. En diversas realizaciones específicas, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de tipos celulares implicados en un trastorno particular para determinar si una composición farmacéutica tiene un efecto deseado sobre tales tipos celulares. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo *in vitro* con líneas celulares.

Puede monitorizarse/evaluarse el efecto de un anticuerpo, un fragmento del mismo o una composición sobre recuentos de linfocitos de sangre periférica usando técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica. Pueden determinarse recuentos de linfocitos de sangre periférica en un sujeto, por ejemplo, obteniendo una muestra de sangre periférica de dicho sujeto, separando los linfocitos de otros componentes de sangre periférica tales como plasma usando, por ejemplo, centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia), y contando los linfocitos usando azul tripano. Pueden determinarse recuentos de células T de sangre periférica en un sujeto, por ejemplo, separando los linfocitos de otros componentes de sangre periférica tales como plasma usando, por ejemplo, un uso de centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia), marcando las células T con un anticuerpo dirigido a un antígeno de célula T que está conjugado a FITC o ficoeritrina, y midiendo el número de células T mediante FACS.

Los anticuerpos, fragmentos o composiciones usados para tratar, gestionar, prevenir o mejorar una infección viral o uno o más síntomas de la misma pueden someterse a prueba para determinar su capacidad para inhibir la replicación viral o reducir la carga viral en ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede someterse a ensayo la replicación viral mediante un ensayo de placas de lisis tal como se describe, por ejemplo, por Johnson *et al.*, 1997, *Journal of Infectious Diseases* 176:1215-1224 176:1215-1224. También pueden someterse a ensayo los anticuerpos o fragmentos de los mismos administrados tal como se describe en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir o regular por disminución la expresión de polipéptidos virales. Para medir la expresión de polipéptidos virales pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, análisis por inmunotransferencia de tipo Western, análisis por transferencia de tipo Northern y RT-PCR.

Los anticuerpos, fragmentos o composiciones usados para tratar, gestionar, prevenir o mejorar una infección bacteriana o uno o más síntomas de la misma pueden someterse a prueba en ensayos *in vitro* que se conocen bien en la técnica. También pueden usarse ensayos *in vitro* conocidos en la técnica para someter a prueba la existencia o el desarrollo de resistencia de bacterias a una terapia. Tales ensayos *in vitro* se describen en Gales *et al.*, 2002, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 44(3):301-311; Hicks *et al.*, 2002, *Clin. Microbiol. Infect.* 8(11): 753-757; y Nicholson *et al.*, 2002, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 44(1): 101-107.

Los anticuerpos, fragmentos o composiciones usados para tratar, gestionar, prevenir o mejorar una infección fúngica o uno o más síntomas de la misma pueden someterse a prueba para determinar la actividad antifúngica contra diferentes especies de hongos. Puede usarse cualquiera de los ensayos antifúngicos convencionales bien conocidos en la técnica para evaluar la actividad antifúngica de una terapia. Puede someterse a prueba el efecto antifúngico sobre diferentes especies de hongos. Pueden usarse las pruebas recomendadas por el National Committee for Clinical Laboratories (NCCLS) (véase National Committee for Clinical Laboratories Standards. 1995, Proposed Standard M27T. Villanova, Pa.) y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica (Pfaller *et al.*, 1993, *Infectious Dis. Clin. N. Am.* 7: 435-444) para evaluar el efecto antifúngico de una terapia. También pueden determinarse las propiedades antifúngicas de una terapia a partir de un ensayo de lisis fúngico, así como mediante otros métodos, incluyendo, entre otros, ensayos de inhibición del crecimiento, ensayos de viabilidad fúngica basados en fluorescencia, análisis de citometría de flujo y otros ensayos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, puede someterse a prueba la actividad antifúngica de una terapia usando métodos de macrodilución y/o métodos de microdilución usando protocolos bien conocidos para los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Clancy *et al.*, 1997 *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11): 2878-82; Ryder *et al.*, 1998, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(5): 1057-61; documentos US 5.521.153; US 5.883.120, US 5.521.169). En resumen, se cultiva una cepa fúngica en unos medios líquidos apropiados y se hace crecer a una temperatura apropiada, dependiendo de la cepa fúngica particular usada durante un periodo de tiempo determinado, que también depende de la cepa fúngica particular usada. Entonces se prepara fotométricamente un inóculo y se hace corresponder la turbidez de la suspensión con la de un patrón, por ejemplo, un patrón de McFarland. El efecto de una terapia sobre la turbidez del inóculo se determina visual o espectrofotométricamente. Se determina la concentración inhibitoria mínima ("CIM") de la terapia, que se define como la menor concentración del compuesto líder que previene el crecimiento visible de un inóculo según se mide determinando la turbidez del cultivo.

También puede determinarse la actividad antifúngica de una terapia usando ensayos colorimétricos bien conocidos por un experto en la técnica. Un ensayo colorimétrico a modo de ejemplo que puede usarse para evaluar la actividad antifúngica de una terapia se describe por Pfaller *et al.* (1994, *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8): 1993-6; véase también Tiballi *et al.*, 1995, *Journal of Clinical Microbiology*, 33(4): 915-7). Este ensayo emplea un criterio de valoración colorimétrico usando un indicador de oxidación-reducción (Alamar Biosciences, Inc., Sacramento CA).

También puede determinarse la actividad antifúngica de una terapia usando ensayos fotométricos bien conocidos por un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, Clancy *et al.*, 1997 *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11): 2878-82; Jahn *et al.*, 1995, *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3): 661-667). Este ensayo fotométrico se basa en cuantificar la respiración mitocondrial de hongos viables mediante la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) para dar formazán. Las CIM determinadas mediante este ensayo se definen como la mayor concentración de la terapia de prueba asociada con la primera disminución abrupta de la densidad óptica. La terapia puede someterse a ensayo para determinar la actividad antifúngica usando ensayos de macrodilución, microdilución y MTT en paralelo.

Además, puede usarse cualquier ensayo *in vitro* conocido por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de una terapia con anticuerpos dada a conocer en el presente documento para un trastorno particular o uno o más síntomas del mismo.

5 Los anticuerpos, composiciones o terapias de combinación pueden someterse a ensayo en sistemas de modelo animal adecuados antes de su uso en seres humanos. Tales sistemas de modelo animal incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Varios aspectos del procedimiento pueden variar; dichos aspectos incluyen, pero no se limitan, al régimen temporal de administración de las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos) tanto si tales terapias se administran por separado o como una mezcla, y la frecuencia de administración de las terapias.

15 Pueden usarse modelos animales para evaluar la eficacia de los anticuerpos, fragmentos de los mismos o composiciones para tratar, gestionar, prevenir o mejorar un trastorno particular o uno o más síntomas del mismo.

Puede someterse a prueba la administración de anticuerpos, generados según los métodos de la invención, o composiciones o terapias de combinación que comprenden tales anticuerpos, para determinar su capacidad para disminuir el transcurso en el tiempo de un trastorno particular en al menos el 25%, preferiblemente al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 95% o al menos el 99%. También pueden someterse a prueba los anticuerpos, composiciones o terapias de combinación para determinar su capacidad para aumentar el periodo de supervivencia de seres humanos que padecen un trastorno particular en al menos el 25%, preferiblemente al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 95% o al menos el 99%. Además, pueden someterse a prueba anticuerpos, composiciones o terapias de combinación para determinar su capacidad para reducir el periodo de hospitalización de seres humanos que padecen infección respiratoria viral en al menos el 60%, preferiblemente al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 95% o al menos el 99%. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica para analizar la función de los anticuerpos, composiciones o terapias de combinación *in vivo*.

30 Además, puede usarse cualquier ensayo *in vivo* conocido por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de un anticuerpo, un fragmento del mismo, una composición, una terapia de combinación dada a conocer en el presente documento para un trastorno particular o uno o más síntomas del mismo.

35 Puede determinarse la toxicidad y/o eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren terapias que muestran índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse terapias que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no infectadas y así reducir los efectos secundarios.

45 Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración usada. Para cualquier terapia usada en un método descrito en el presente documento, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

55 2.14 Kits

Los kits pueden comprender sub-bancos de regiones de entramado de anticuerpo de una especie de interés o pueden comprender sub-bancos de CDR de una especie de interés. Los kits pueden comprender sub-bibliotecas combinatorias que comprenden una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para una región de entramado (por ejemplo, FR1) fusionada en marco con una CDR correspondiente (por ejemplo, CDR1). Los kits pueden comprender bibliotecas combinatorias que comprenden una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos, codificando cada secuencia de nucleótidos para las regiones de entramado y CDR fusionadas en marco (por ejemplo, FR1+CDR1+FR2+CDR2+FR3+CDR3+FR4).

65 Los kits pueden comprender sub-bancos de regiones de entramado de inmunoglobulina humana, sub-bancos de

CDR, sub-bibliotecas combinatorias y/o bibliotecas combinatorias. Un kit puede comprender un sub-banco de regiones de entramado para la región de entramado 1, 2, 3 y/o 4 de cadena ligera variable, en el que la región de entramado se define según el sistema de Kabat. Alternativamente, un kit puede comprender un sub-banco de regiones de entramado para la región de entramado 1, 2, 3 y/o 4 de cadena ligera variable, en el que la región de entramado se define según el sistema de Chothia. Aún adicionalmente, un kit puede comprender un sub-banco de regiones de entramado para la región de entramado 1, 2, 3 y/o 4 de cadena pesada variable, en el que la región de entramado se define según el sistema de Kabat. Alternativamente un kit puede comprender un sub-banco de regiones de entramado para la región de entramado 1, 2, 3 y/o 4 de cadena pesada variable, en el que la región de entramado se define según el sistema de Chothia. Aún otro kit puede comprender sub-bancos de regiones de entramado tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada.

Un kit o envase farmacéutico puede comprender uno o más recipientes llenados con un anticuerpo humanizado producido mediante un método de la invención. El kit o envase farmacéutico puede comprender además uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad particular. Un kit o envase farmacéutico puede comprender uno o más recipientes llenados con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Opcionalmente asociado con tal(es) recipiente(s) puede haber un aviso en la forma recomendada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia para la fabricación, el uso o la venta para administración a seres humanos.

2.15 Artículo de fabricación

Un producto farmacéutico terminado, acondicionado y etiquetado puede ser un artículo de fabricación que incluye la forma farmacéutica unitaria apropiada en un recipiente o contenedor apropiado tal como un vial de vidrio u otro recipiente que está herméticamente sellado. En el caso de formas farmacéuticas adecuadas para administración parenteral el principio activo es estéril y adecuado para la administración como disolución libre de material particulado. Se describen tanto disoluciones parenterales como polvos liofilizados, siendo cada uno estéril, y siendo estos últimos adecuados para su reconstitución antes de la inyección. Alternativamente, la forma farmacéutica unitaria puede ser un sólido adecuado para administración oral, transdérmica, tópica o mucosa.

La forma farmacéutica unitaria puede ser adecuada para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea. Por tanto, se describen disoluciones, preferiblemente estériles, adecuadas para cada vía de administración.

Como con cualquier producto farmacéutico, el material de acondicionamiento y el recipiente están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y el envío. Además, los productos incluyen instrucciones para su uso u otro material de información que recomiendan al médico, técnico o paciente cómo prevenir o tratar apropiadamente la enfermedad o el trastorno en cuestión. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucciones que indican o sugieren un régimen de dosificación incluyendo, pero sin limitarse a, dosis reales, procedimientos de monitorización (tales como métodos para monitorizar los recuentos de linfocito absolutos medios, recuentos de célula tumorales y tamaño tumoral) y otra información de monitorización.

Más específicamente, un artículo de fabricación puede comprender material de acondicionamiento tal como una caja, frasco, tubo, vial, recipiente, pulverizador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.) o envuelta; y al menos una forma farmacéutica unitaria de un agente farmacéutico contenida dentro de dicho material de acondicionamiento. Un artículo de fabricación puede comprender material de acondicionamiento, tal como una caja, frasco, tubo, vial, recipiente, pulverizador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.) o envuelta; y al menos una forma farmacéutica unitaria de cada agente farmacéutico contenida dentro de dicho material de acondicionamiento.

Un artículo de fabricación puede comprender material de acondicionamiento y un agente farmacéutico e instrucciones contenidas dentro de dicho material de acondicionamiento, en el que dicho agente farmacéutico es un anticuerpo humanizado y un portador farmacéuticamente aceptable, y dichas instrucciones indican un régimen de dosificación para prevenir, tratar o gestionar a un sujeto con una enfermedad particular. Un artículo de fabricación puede comprender material de acondicionamiento y un agente farmacéutico e instrucciones contenidas dentro de dicho material de acondicionamiento, en el que dicho agente farmacéutico es un anticuerpo humanizado, un agente profiláctico o terapéutico distinto del anticuerpo humanizado y un portador farmacéuticamente aceptable, y dichas instrucciones indican un régimen de dosificación para prevenir, tratar o gestionar a un sujeto con una enfermedad particular. Un artículo de fabricación puede comprender material de acondicionamiento y dos agentes farmacéuticos e instrucciones contenidas dentro de dicho material de acondicionamiento, en el que dicho primer agente farmacéutico es un anticuerpo humanizado y un portador farmacéuticamente aceptable y dicho segundo agente farmacéutico es un agente profiláctico o terapéutico distinto del anticuerpo humanizado, y dichas instrucciones indican un régimen de dosificación para prevenir, tratar o gestionar a un sujeto con una enfermedad particular.

Efectos adversos que pueden reducirse o evitarse pueden indicarse en material de información incluido en un artículo de fabricación para su uso en la prevención, tratamiento o mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad. Los efectos adversos que pueden reducirse o evitarse incluyen, pero no se limitan a, anomalías de signos vitales (por ejemplo, fiebre, taquicardia, bradicardia, hipertensión, hipotensión), acontecimientos

hematológicos (por ejemplo, anemia, linfopenia, leucopenia, trombocitopenia), cefalea, escalofríos, mareo, náuseas, astenia, dolor de espalda, dolor torácico (por ejemplo, presión en el tórax), diarrea, mialgia, dolor, prurito, psoriasis, rinitis, sudoración, reacción en el sitio de la inyección y vasodilatación. Dado que algunas de las terapias pueden ser inmunosupresoras, la inmunosupresión prolongada puede aumentar el riesgo de infección, incluyendo infecciones oportunistas. La inmunosupresión prolongada y sostenida también puede dar como resultado un aumento del riesgo de desarrollo de determinados tipos de cáncer.

Además, el material de información incluido en un artículo de fabricación puede indicar que las proteínas foráneas también pueden dar como resultado reacciones alérgicas, incluyendo anafilaxia o síndrome de liberación de citosinas. El material de información debe indicar que las reacciones alérgicas pueden mostrarse sólo como exantemas pruriginosos leves o pueden ser intensas tales como eritroderma, síndrome de Stevens Johnson, vasculitis o anafilaxia. El material de información también debe indicar que las reacciones anafilácticas (anafilaxia) son reacciones de hipersensibilidad graves y en ocasiones mortales. Pueden producirse reacciones alérgicas, incluyendo anafilaxia, cuando se inyecta cualquier proteína foránea en el organismo. Puede oscilar entre manifestaciones leves tales como urticaria o exantema y reacciones sistémicas mortales. Las reacciones anafilácticas se producen poco después de la exposición, habitualmente en el plazo de 10 minutos. Los pacientes pueden experimentar parestesia, hipotensión, edema laríngeo, cambios en el estado mental, angioedema facial o faríngeo, obstrucción de las vías respiratorias, broncoespasmos, urticaria y prurito, enfermedad del suero, artritis, nefritis alérgica, glomerulonefritis, artritis temporal o eosinofilia.

El material de información también puede indicar que el síndrome de liberación de citocinas es un síndrome clínico agudo, temporalmente asociado con la administración de determinados anticuerpos activantes anti-células T. El síndrome de liberación de citocinas se ha atribuido a la liberación de citocinas mediante linfocitos activados o monocitos. Las manifestaciones clínicas para el síndrome de liberación de citocinas han oscilado entre una enfermedad "de tipo gripe", autolimitada, leve, notificada con más frecuencia y una reacción de tipo choque, potencialmente mortal, intensa, notificada con menos frecuencia, que puede incluir manifestaciones graves cardiovasculares, pulmonares y en el sistema nervioso central. Normalmente el síndrome comienza de aproximadamente 30 a 60 minutos tras la administración (pero puede producirse más tarde) y puede persistir durante varias horas. La frecuencia e intensidad de este complejo de síntomas es habitualmente mayor con la primera dosis. Con cada dosis sucesiva, tanto la incidencia como la intensidad del síndrome tienden a disminuir. Aumentar la cantidad de una dosis o reiniciar el tratamiento tras una interrupción puede dar como resultado la reaparición del síndrome. Los métodos de tratamiento y prevención descritos en el presente documento pueden evitar o reducir uno o más de los efectos adversos comentados en el presente documento.

5.0 Ejemplos

Reactivos

Todos los compuestos químicos fueron de calidad analítica. Se adquirieron enzimas de restricción y enzimas modificadoras del ADN de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Se adquirieron oligonucleótidos y ADN polimerasa de *pfu* de Invitrogen (Carlsbad, CA). Se expresó proteína de fusión EphA2 humano-Fc (que consistía en EphA2 humano fusionado con la porción Fc de una IgG1 humana (Carles-Kinch *et al.* Cancer Res. 62: 2840-2847 (2002)) en células de riñón embrionario humano (HEK) 293 y se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína G usando protocolos convencionales. Se adquirieron perlas magnéticas con estreptavidina de Dynal (Lake Success, NY). Se llevó a cabo la biotilación de EphA2 humano-Fc usando un kit de sulfo-NHS-LC-biotilación EZ-Link según las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL).

5.1- Clonación y secuenciación del anticuerpo monoclonal original

MedImmune, Inc. adquirió una línea celular de hibridoma murino (B233) que secretaba un anticuerpo monoclonal (mAb) preparado contra la tirosina cinasa receptora humana EphA2 (Kinch *et al.* Clin. Exp. Metastasis. 20:59-68 (2003)). A este mAb de ratón se le denomina mAb B233 a continuación en el presente documento. Se llevó a cabo la clonación y secuenciación de los genes de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) variable del mAb B233 tras el aislamiento y la purificación del ARN mensajero de B233 usando un kit de purificación de ARNm Straight A's (Novagen, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc con un kit de síntesis de ADNc de primera cadena (Novagen, Madison, WI) según las recomendaciones del fabricante. Se llevó a cabo la amplificación de los genes tanto de V_H como de V_L usando los oligonucleótidos IgGV_H e IgkV_L del conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen, Madison, WI) según las sugerencias del fabricante. Se clonaron fragmentos de ADN resultantes de amplificaciones productivas en pSTBlue-1 usando el kit de clonación Perfectly Blunt (Novagen, Madison, WI). Entonces se secuenciaron múltiples clones de V_H y V_L mediante el método de terminación de cadena de didesoxilo (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467 (1977)) usando un secuenciador ABI3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). En la figura 1 se muestran las secuencias consenso de los genes de V_L (V_L -233) y V_H (V_H -233) del mAb B233.

5.2- Selección de las regiones de entramado humanas

Se seleccionaron genes de región de entramado humana de agrupamientos públicamente disponibles de genes de línea germinal de anticuerpo. Más precisamente, esto incluyó 46 genes de cadena kappa de línea germinal humana (A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 y O8; K.F. Schable, *et al.*, Biol. Chem. Hoppe Seiler 374:1001-1022, (1993); J. Brensing-Kuppers, *et al.*, Gene 191:173-181(1997)) para la 1ª, 2ª y 3ª regiones de entramado y 5 secuencias J de línea germinal humana para la 4ª región de entramado (Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4 y Jκ5; P.A. Hieter, *et al.*, J. Biol. Chem. 257:1516-1522 (1982)). La porción de cadena pesada de la biblioteca incluyó 44 secuencias de cadena pesada de línea germinal humana (VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, V1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1 y VH7-8; F. Matsuda, *et al.*, J. Exp. Med. 188:1973-1975 (1998)) para la 1ª, 2ª y 3ª regiones de entramado y 6 secuencias J de línea germinal humana para la 4ª región de entramado (JH1, JH2, JH3, JH4, JH5 y JH6; J.V. Ravetch, *et al.*, Cell 27(3 Pt 2): 583-591 (1981)).

5.3- Construcción de las bibliotecas con intercambio de región de entramado

5.3.1- Descripción de las bibliotecas

Se construyeron tres bibliotecas con intercambio de región de entramado principales (biblioteca A, B y C). La biblioteca A incluyó una sub-biblioteca con intercambio de región de entramado de cadena ligera (sub1 de VL) emparejada con la cadena pesada del mAb B233 (VH-233). La biblioteca B incluyó una sub-biblioteca con intercambio de región de entramado de cadena pesada (sub1 de VH) emparejada con las cadenas ligeras con intercambio de región de entramado fijas VL-12C8 y VL- 8G7 (véanse las secciones 5.4.1.1, 5.4.1.2 y 5.4.1.3). La biblioteca C incluyó una sub-biblioteca con intercambio de región de entramado de cadena ligera (sub2 de VL) emparejada con una sub-biblioteca con intercambio de región de entramado de cadena pesada (sub2 de VH).

La construcción de las sub-bibliotecas de VH y VL con intercambio de región de entramado se llevó a cabo usando los oligonucleótidos mostrados en las tablas 1-7 y 11. Más precisamente, los oligonucleótidos descritos en las tablas 1-7 y 11 codifican para las secuencias completas de todos los genes de línea germinal de región de entramado humana conocidos para las cadenas ligera (κ) y pesada, definición de Kabat. Los oligonucleótidos descritos en las tablas 64 y 65 codifican para parte de las CDR del mAb B233 y son solapantes con las regiones de entramado de línea germinal humana correspondientes. Con respecto a la tabla 64, con la excepción de AL1-13 y DL1Ü-4Ü, cada oligonucleótido codifica para porciones de una CDR del mAb B233 (subrayada) y de una región de entramado de cadena ligera de línea germinal humana (definición de Kabat; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, BNational Institutes of Health, Washington, DC, 1991). CDRL1, L2 y L3 se codifican por AL1Ü-10Ü/BL1-10, BL1Ü-16Ü/CL1-11 y CL1Ü-12Ü/DL1-4, respectivamente. Los oligonucleótidos AL1-13 contienen una secuencia solapante líder del gen 3 de M13 (en negrita) y los oligonucleótidos DL1Ü-4Ü contienen una secuencia solapante de Cκ (en negrita). Con respecto a la tabla 65, con la excepción de AH1-10 y DH1Ü-3Ü, cada oligonucleótido codifica para porciones de una CDR del mAb B233 (subrayada) y de una región de entramado de cadena pesada de línea germinal humana (definición de Kabat). CDRH1, H2 y H3 se codifican por AH1Ü-17Ü/BH1-17, BH1Ü-16Ü/CH1-15 y CH1Ü-13Ü/DH1-3, respectivamente. Los oligonucleótidos AH1-10 contienen una secuencia solapante líder del gen 3 de M13 (en negrita) mientras que los oligonucleótidos DH1Ü-3Ü contienen una secuencia solapante de Cκ1 (en negrita). (K=G o T, M=A o C, R=A o G, S=C o G, W=A o T e Y=C o T).

Tabla 64. Oligonucleótidos usados para la fusión de CDR de cadena ligera de mAb B233 con regiones de entramado de cadena ligera de línea germinal humana.

1589	AL1	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGATGTTGTGATGACWCAGTCT-3'
1590	AL2	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGACATCCAGATGAYCCAGTCT-3'
1591	AL3	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGCCATCCAGWTGACCCAGTCT-3'
1592	AL4	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAATAGTGATGAYGCAGTCT-3'
1593	AL5	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAATTGTGTTGACRCAGTCT-3'
1594	AL6	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAKATTGTGATGACCCAGACT-3'
1595	AL7	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAATTGTRMTGACWCAGTCT-3'
1596	AL8	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAYATYGTGATGACYCAGTCT-3'
1597	AL9	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAACGACACTCACGCAGTCT-3'
1598	AL10	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGACATCCAGTTGACCCAGTCT-3'
1599	AL11	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCAACATCCAGATGACCCAGTCT-3'
1600	AL12	5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGCCATCCGGATGACCCAGTCT-3'

1601	<u>AL13</u>	<u>5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGTCATCTGGATGACCCAGTCT-3'</u>
1602	<u>AL1Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGGAGGCCGGC-3'</u>
1603	<u>AL2Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGAGGGTGRCTCTTTC-3'</u>
1604	<u>AL3Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTACAASTGATGGTGA CTCTGTC-3'</u>
1605	<u>AL4Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGAAGGAGATGGAGGCCGGCTG-3'</u>
1606	<u>AL5Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGGAGGCCTGCTC-3'</u>
1607	<u>AL6Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGTTGACTTTGTC-3'</u>
1608	<u>AL7Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGTGATGGTGA CTTTCTC-3'</u>
1609	<u>AL8Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGTTGATGGTGGCCCTCTC-3'</u>
1610	<u>AL9Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAAGTGA TGGTGA CTCTGTC-3'</u>
1611	<u>AL10Ü</u>	<u>5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAAATGA TACTGA CTCTGTC-3'</u>
1612	<u>BL1</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGYTT CAGCAGAGGCCAGGC-3'</u>
1613	<u>BL2</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGS-3'</u>
1614	<u>BL3</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTATCRGCAGAAACCAGGG-3'</u>
1615	<u>BL4</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTACCARCAGAAACCAGGA-3'</u>
1616	<u>BL5</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTACCARCAGAAACCTGGC-3'</u>
1617	<u>BL6</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTACCARCAGAAACCTGGC-3'</u>
1618	<u>BL7</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTATCAGCARAAACCWGS-3'</u>
1619	<u>BL8</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTAYCAGCARAAACCAG-3'</u>
1620	<u>BL9</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTTTCTGCAGAAAGCCAGG-3'</u>
1621	<u>BL10</u>	<u>5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA CACTGGTTTCAGCAGAAACCAGGG-3'</u>
1622	<u>BL1Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCA GGAGCTGTGGAG-3'</u>
1623	<u>BL20</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCA GGAGCTTAGGRGC-3'</u>
1624	<u>BL3Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATGA GGAGCCTGGGMGC-3'</u>
1625	<u>BL4Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATARTAGATCA GGMGCTTAGGGGC-3'</u>
1626	<u>BL5Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCA GGWGCTTAGGRAC-3'</u>
1627	<u>BL6Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATGA AGAGCTTAGGGGC-3'</u>
1628	<u>BL7Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAAATTAG GAGTCTTGGAGG-3'</u>
1629	<u>BL8Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAGTAAATGA GCAGCTTAGGAGG-3'</u>
1630	<u>BL9Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCA GGAGTGTGGAGAC-3'</u>
1631	<u>BL10Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCA GGAGCTCAGGGGC-3'</u>
1632	<u>BL11Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCA GGACTTAGGGGC-3'</u>
1633	<u>BL12Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGAGGA AGAGCTTAGGGGA-3'</u>
1634	<u>BL13Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATACTTGATGA GGAGCTTTGGAGA-3'</u>
1635	<u>BL14Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATAATAAATTAG GCGCCTTAGGAGA-3'</u>
1636	<u>BL15Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATACTTGATGA GGAGCTTTGGGGC-3'</u>
1637	<u>BL16Ü</u>	<u>5'-GATGGACTGGAAAACATATTGAATAAT GAAAATAGCAGC-3'</u>
1638	<u>CL1</u>	<u>5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCC AGACAGATTCAGY-3'</u>
1639	<u>CL2</u>	<u>5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGY-3'</u>
1744	<u>CL3</u>	<u>5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGYATCCC AGCCAGGTTTCAGT-3'</u>
1745	<u>CL4</u>	<u>5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGRGTCCC WGACAGGTTTCAGT-3'</u>
1746	<u>CL5</u>	<u>5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTAGCATCCC AGCCAGGTTTCAGT-3'</u>

1747	CL6	5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGT-3'
1748	CL7	5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGAATCCCACCTCGATTTCAGT-3'
1749	CL8	5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCCTGACCGATTTCAGT-3'
1750	CL9	5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT-3'
1751	CL10	5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCTCATCGAGGTTTCAGT-3'
1752	CL11	5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGT-3'
1753	CL1Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGKCAGTAATAAACCCCAACATC-3'
1754	CL2Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAYGTTGCAGCATC-3'
1755	CL3Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACMGTAAATAAGTTGCAACATC-3'
1756	CL4Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGRCAGTAATAAGTTGCAAAATC-3'
1757	CL5Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAARCTGCAAAATC-3'
1758	CL6Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACARTAGTAAGTTGCAAAATC-3'
1759	CL7Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGGCAGTAATAAACTCCAAMATC-3'
1760	CL8Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGGCAGTAATAAACCCCGACATC-3'
1761	CL9Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGAAGTAATATGCAGCATC-3'
1762	CL210Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATATGTTGCAATATC-3'
1763	CL11Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATACACTGCAAAATC-3'
1764	CL12Ü	5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAAACTGCCACATC-3'
1765	DL1	5'-CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTYGGCCARGGGACCAAGSTG-3'
1766	DL2	5'-CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGGACACGACTG-3'
1767	DL3	5'-CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGGCCCTGGGACCAAAGTG-3'
1768	DL4	5'-CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTG-3'
1769	DL1Ü	5'-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATYTCCACCTTGG-3'
1770	DL2Ü	5'-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATCTCCAGCTTGG-3'
1771	DL3Ü	5'-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATATCCACTTTGG-3'
1772	DL4Ü	5'-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTAATCTCCAGTCGTG-3'

Tabla 65. Oligonucleótidos usados para la fusión de CDR de cadena pesada de mAb B233 con regiones de entramado de cadena pesada de línea germinal humana.

1640	AH1	5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT-3'
1641	AH2	5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT-3'
1642	AH3	5'-GTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG-3'
1643	AH4	5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTCACCTTGARGGAGTCT-3'
1644	AH5	5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCARATGCAGCTGGTGCAGTCT-3'
1645	AH6	5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCGARGTGCAGCTGGTGSAGTC-3'
1646	AH7	5'-GCPGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGATCACCTTGAAGGAGTCT-3'
1647	AH8	5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT-3'
1648	AH9	5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCT-3'
1649	AH10	5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG-3'
1650	AH1Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCRGTGAAGGTGTATCCAGAAGC-3'
1651	AH2Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCGCTGAGTGAGAACCCAGAGAM-3'
1652	AH3Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCACTGAARGTGAATCCAGAGGC-3'
1653	AH4Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCACTGACGGTGAAYCCAGAGGC-3'

ES 2 458 636 T3

1654	AH50	5'-GTTTCATGGAGTAATCGCTGAYGGAGCCACCAGAGAC-3'
1655	AH6Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCRGTAAAGGTGWAWCCAGAAGC-3'
1656	AH7Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCACTRAAGGTGAAYCCAGAGGC-3'
1657	AH8Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCGGTRAARCTGTAWCCAGAASC-3'
1658	AH90	5'-GTTTCATGGAGTAATCAYCAAAGGTGAATCCAGARGC-3'
1659	AH10Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCRCTRAAGGTGAATCCAGASGC-3'
1660	AH11Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCGGTGAAGGTGTATCCRGAWGC-3'
1661	AH12Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCACTGAAGGACCCACCATAGAC-3'
1662	AH13Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCACTGATGGAGCCACCAGAGAC-3'
1663	AH14Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCGCTGATGGAGTAACCAGAGAC-3'
1664	AH15Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCAGTGAGGGTGTATCCGAAAAC-3'
1665	AH16Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCGCTGAAGGTGCCTCCAGAAGC-3'
1666	AH17Ü	5'-GTTTCATGGAGTAATCAGAGACACTGTCCCCGGAGAT-3'
1667	BH1	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTGCGACAGGCYCCTGGA-3'
1668	BH2	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTGCGMCAGGCCCCCGGA-3'
1669	BH3	5'-GATTACTCCATGAACTGGATCCGTCAGCCCCCAGGR-3'
1670	BH4	5'-GATTACTCCATGAACTGGRTCCGCCAGGCTCCAGGG-3'
1671	BH5	5'-GATTACTCCATGAACTGGATCCGSCAGCCCCCAGGG-3'
1672	BH6	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTCCGSCAAGCTCCAGGG-3'
1673	BH7	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTCCRTCARGCTCCRGGR-3'
1674	BH8	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTSCGMCARGCYACWGGA-3'
1675	BH9	5'-GATTACTCCATGAACTGGKTCCGCCAGGCTCCAGGS-3'
1676	BH10	5'-GATTACTCCATGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCG-3'
1677	BH11	5'-GATTACTCCATGAACTGGGCCCGCAAGGCTCCAGGA-3'
1678	BH12	5'-GATTACTCCATGAACTGGATCCGCCAGCACCCAGGG-3'
1679	BH13	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGG-3'
1680	BH14	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTGCGCCAGATGCCCGGG-3'
1681	BH15	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTGCGACAGGCTCGTGGA-3'
1682	BH16	5'-GATTACTCCATGAACTGGATCCGGCAGCCCGCCGGG-3'
1683	BH17	5'-GATTACTCCATGAACTGGGTGCCACAGGCCCCCTGGA-3'
1684	BH1Ü	5'-TGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATCCCATCCACTCAAGCCYTTG-3'
1685	BH2Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATCCCATCCACTCAAGCSCTT-3'
1686	BH3Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAWGAGACCCACTCCAGCCCCTT-3'
1687	BH4Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAACCCAATCCACTCCAGKCCCTT-3'
1688	BH5Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATGAGACCCACTCCAGRCCCTT-3'
1689	BH6Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAGCCAACCCACTCCAGCCYTT-3'
1690	BH7Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAKGCCACCCACTCCAGCCCCTT-3'
1691	BH8Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATCCCAGCCACTCAAGGCCTC-3'
1692	BH9Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAACCCCATCCACTCCAGGCCTT-3'
1693	BH10Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATGARACCCACWCCAGCCCCTT-3'
1694	BH11Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAMGAKACCCACTCCAGMCCCTT-3'
1695	B12Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAAYCCMATCCACTCMAGCCCYTT-3'

ES 2 458 636 T3

1696	1BH13Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATCCTATCCACTCAAGGCGTTG-3'
1697	BH14Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATGCAAGCCACTCCAGGGCCTT-3'
1698	BH15Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATGAAACATATTCCAGTCCCTT-3'
1699	BH16Ü	5'-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAACGATACCCACTCCAGCCCCTT-3'
1700	CH1	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACCATGACCAGGRAC- 5'- 3'
1701	CH2	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGGCTCACCATCWCCAAGGAC- 5'- 3'
1702	CH3	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAGTYACCATATCAGTAGAC-3' 5'-
1703	CH4	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGRGAC- 5'- 3'
1704	CH5	5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGATTCCACCATCTCMAGAGA- 3'
1705	CH6	5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTMGGTTCACCATCTCCAGAGA- 3'
1706	CH7	5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGATTCAYCATCTCCAGAGA- 3'
1707	CH8	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAGTCACCATRTRCMGTAGAC- 5'- 3'
1708	CH9	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGRGTACCATKACCAGGGAC- 5'- 3'
1709	CH10	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCAGGTCACCATCTCAGCCGAC- 5'- 3'
1710	CH11	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAATAACCATCAACCCAGAC-3 5-
1711	CH12	5'-CTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTTGTCTTCTCCATGGAC- 3'
1712	CH13	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACCATGACCGAGGAC- 5'- 3'
1713	CH14	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACGATTACCGCGGAC- 5'- 3'
1714	CH15	GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACCATGACCACAGAC- 5'- 3'
1715	CH1Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTAGYACAGTAATACACGGC-3'
1716	CH2Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCGCACAGTAATACAYGGC-3'
1717	CH3Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTYGCACAGTAATACACAGC-3'
1718	CH4Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATGYYGCACAGTAATACACGGC-3'
1719	CH5Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTACCGTGACARTAATAYGTGGC-3'
1720	CH6Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTGGCACAGTAATACACGGC-3'
1721	CH7Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATGTGGTACAGTAATACACGGC-3'
1722	CH8Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCGCACAGTGATACAAGGC-3'

1723	CH9Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATTTTGCACAGTAATACAAGGC-3'
1724	CH10Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTTGCACAGTAATACATGGC-3'
1725	CH11Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTAGTGTGCACAGTAATATGTGGC-3'
1726	CH12Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATTTTGCACAGTAATATACGGC-3'
1727	CH13Ü	5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCACACAGTAATACACAGC-3'
1728	DH1	5'-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGCCARGGMACCCTGGTC-3'
1729	DH2	5'-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGSCAAGGGACMAYGGTC-3'
1730	DH3	5'-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTC-3'
1731	DH1Ü	5'-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACRGTGACCAGGGT-3'
1732	DH2Ü	5'-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACRGTGACCRTKGT-3'
1733	H3Ü	5'-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3'

5.3.2- Construcción de las sub-bibliotecas de V_H y V_L

- Se ensambló secuencialmente la sub-biblioteca sub1 de V_L usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante extensión por solapamiento. Ho *et al.*, Gene 77:51-59 (1989). Más precisamente, se llevaron a cabo las denominadas PCR "intermedias" para sintetizar cada región de entramado de línea germinal humana individual fusionada en marco con una porción de las CDR donadoras correspondientes usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos: AL1-13/AL1Ü-10Ü/1-46, BL1-10/BL1Ü-16Ü/47-92, CL1-11/CL1Ü-12Ü/93-138 y DL1-4/DL1Ü-4Ü/139-143 para la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª regiones de entramado, respectivamente. Esto se llevó a cabo usando ADN polimerasa de *pfu* (PCR SuperMix, Invitrogen) en un volumen de 100 µl y aproximadamente 5 pmol de oligonucleótidos AL1-13, AL1Ü-10Ü, BL1-10, BL1Ü-16Ü, CL1-11, CL1Ü-12Ü, DL1-4 y DL1Ü-4Ü y aproximadamente 100 pmol de oligonucleótidos 1-143. El programa de PCR consistió en 5 min. a 95°C; 1 min. a 94°C, 1 min. a 45°C, 1 min. a 72°C durante 30 ciclos y después 8 min. a 72°C. Entonces se llevó a cabo una segunda PCR ("PCR de ensamblaje") usando ADN polimerasa de *pfu* (PCR SuperMix, Invitrogen), 0,5-2 µl de cada una de las PCR "intermedias", 25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos DL1Ü, DL2Ü, DL3Ü, DL4Ü (véase la tabla 64) y 100 pmol del oligonucleótido biotinilado 5'-GGTCGTTCCATTTACTCCCAC-3' (SEQ ID NO. 1734) en un volumen de reacción de 100 µl. El programa de PCR de ensamblaje consistió en 5 min. a 95°C; 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, 45 s a 72°C durante 30 ciclos y después 8 min. a 72°C.
- También se sintetizaron las sub-bibliotecas con intercambio de región de entramado sub1 de V_H , sub2 de V_H y sub2 de V_L usando la PCR mediante extensión por solapamiento. Ho *et al.*, Gene 77:51-59 (1989). Esta síntesis *in vitro* total de los genes de V_H y V_L con intercambio de región de entramado se realizó esencialmente tal como se describe en H. Wu *et al.*, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003). En resumen, se llevó a cabo una primera PCR denominada "de fusión" usando ADN polimerasa de *pfu* (PCR SuperMix, Invitrogen). Se llevó a cabo la construcción de sub1 de V_H usando aproximadamente 3-10 pmol de cada uno de los oligonucleótidos descritos en las tablas 5, 6, 7, 11 y 65 en un volumen de reacción de 100 µl. Se llevó a cabo la construcción de sub2 de V_H usando aproximadamente 0,5 pmol de cada uno de los oligonucleótidos descritos en las tablas 5, 6, 7, 11 y 65 en un volumen de reacción de 100 µl. Se llevó a cabo la construcción de sub2 de V_L usando aproximadamente 0,5 pmol de cada uno de los oligonucleótidos descritos en las tablas 1, 2, 3, 4, y 64 en un volumen de reacción de 100 µl. Para cada sub-biblioteca sub1 de V_H , sub2 de V_H y sub2 de V_L , el programa de PCR de fusión consistió en 1 min. a 95°C; 20 s a 94°C, 30 s a 50°C, 30 s a 72°C durante 5 ciclos; 20 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C durante 25 ciclos y después 7 min. a 72°C. Entonces siguió una segunda PCR denominada "de síntesis". Más precisamente, se sintetizaron las sub-bibliotecas sub1 de V_H y sub2 de V_H usando ADN polimerasa de *pfu* (PCR SuperMix, Invitrogen), 2-3 µl de la "PCR de fusión" correspondiente, 30 pmol de cada uno de los oligonucleótidos DH1Ü, DH2Ü, DH3Ü (véase la tabla 65) y 100 pmol del oligonucleótido biotinilado 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCC-3' (SEQ ID NO. 1735) en un volumen de reacción de 100 µl. Se sintetizó la sub-biblioteca sub2 de V_L usando ADN polimerasa de *pfu* (PCR SuperMix, Invitrogen), 3 µl de la "PCR de fusión" correspondiente, 25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos DL1Ü, DL2Ü, DL3Ü, DL4Ü (véase la tabla 64) y 100 pmol del oligonucleótido biotinilado 5'-GGTCGTTCCATTTACTCCCAC-3' (SEQ ID NO. 1734) en un volumen de reacción de 100 µl. Para cada sub-biblioteca sub1 de V_H , sub2 de V_H y sub2 de V_L , el programa de PCR de síntesis consistió en 5 min. a 94°C; 1 min. a 94°C, 1 min. a 45°C, 1 min. a 72°C durante 30 ciclos y después 8 min. a 72°C.

5.3.3- Síntesis de los genes V_L -12C8 y V_L -8G7

- Se sintetizaron los genes de cadena ligera V_L -12C8 y V_L -8G7, usados en el contexto de biblioteca B (V_L -12C8+ V_L -8G7+ sub1 de V_H), mediante PCR a partir del vector de fago M13 que codifica para la región V correspondiente (véanse las secciones 5.4.1.1, 5.4.1.2, 5.4.1.3) usando las combinaciones de oligonucleótidos 12C8for/12C8back y 8G7for/8G7back, respectivamente (véase a continuación).

12C8for 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGATCCAGTTGACTCAGTCTCC-3'(biotinilado) (SEQ ID NO. 1736)

5 12C8back 5'-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGTATCTCCAGCTTGGTCCCTCC-3' (SEQ ID NO. 1737)

8G7for 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG-3' (biotinilado) (SEQ ID NO. 1738)

10 8G7back 5'-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGTATCTCCACTTTGGTCCCTC-3' (SEQ ID NO. 1739).

15 Los oligonucleótidos 12C8for y 8G7for contienen una secuencia solapante líder del gen 3 de M13 (en negrita). Los oligonucleótidos 8G7back y 12C8back contienen una secuencia solapante de Cκ (subrayada).

5.3.4- Síntesis de los genes V_H-233 y V_L-233

20 Se sintetizaron los genes de cadena pesada y ligera V_H-233 y V_L-233, usados en el contexto de un control positivo de Fab quimérico (V_H-233+V_L-233) o de la biblioteca A (sub1 de V_L+V_H-233), mediante PCR a partir del vector pSTBlue-1 correspondiente (véase la sección 5.1) usando las combinaciones de oligonucleótidos 233Hfor/233Hback y 233Lfor/233Lback, respectivamente (véase a continuación).

25 233Hfor 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG-3' (biotinilado) (SEQ ID NO. 1740)

233Hback 5'-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCTTG-3' (SEQ ID NO. 1741)

30 233Lfor 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTG -3' (biotinilado) (SEQ ID NO. 1742)

35 233Lback 5'-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCAGCACCG AACG-3' (SEQ ID NO. 1743)

Los oligonucleótidos 233Hfor y 233Lfor contienen una secuencia solapante líder del gen 3 de M13 (en negrita). El oligonucleótido 233Hback contiene una secuencia solapante de Cκ1 (subrayada). El oligonucleótido 233Lback contiene una secuencia solapante de Cκ (subrayada).

40 5.3.5- Clonación de las diversas regiones V en un vector de expresión de fago

Se clonaron las bibliotecas A, B y C así como la versión de Fab quimérico de mAb B233 en un vector de expresión de fago basado en M13. Este vector permite la expresión de fragmentos Fab que contienen el primer dominio constante de una cadena pesada □1 humana y el dominio constante de una cadena ligera kappa (κ) humana bajo el control del promotor *lacZ* (figura 2). Se llevó a cabo la clonación mediante mutagénesis por hibridación, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987), tal como describieron Wu *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 207: 213-233 (2003). En resumen, se purificó ADN monocatenario negativo correspondiente a las diversas regiones V de interés (véanse las secciones 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4) a partir de los productos de PCDR finales mediante precipitación en etanol tras la disociación del producto de PCR bicatenario usando hidróxido de sodio y eliminación de la cadena biotinilada mediante perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina tal como se describe (H. Wu, *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 207: 213-233(2003); H. Wu, *Methods Mol. Biol.* 207: 197-212 (2003)). Se mezclaron cantidades equimolares de diferentes cadenas negativas de la siguiente manera: V_H-233/sub1 de V_L, sub1 de V_H/V_L-8G7/V_L-12C8, sub2 de V_H/sub2 de V_L y V_H-233 N_L-233 para construir la biblioteca A, biblioteca B, biblioteca C y Fab 233 quimérico, respectivamente. Entonces se hibridaron individualmente estas mezclas diferentes con dos regiones del vector que contenían cada una un bucle palindrómico. Estos bucles contenían un sitio XbaI único que permite la selección de los vectores que contienen cadenas tanto V_L como V_H fusionadas en marco con la región constante kappa (κ) humana y la primera región constante □ humana, respectivamente. Entonces se sometió el ADN sintetizado a electroporación en XL1-Blue para determinar la formación de placas de lisis en césped bacteriano de XL1-Blue o la producción de fragmentos Fab tal como describieron Wu *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 207: 213-233 (2003).

5.4- Examen de las bibliotecas

5.4.1- Examen primario

65 5.4.1.1- Descripción

El examen primario consistió en un ensayo ELISA de un único punto (SPE) que se llevó a cabo usando extractos periplásmicos preparados a partir de 1 ml de cultivo bacteriano que se hizo crecer en placas de 96 pocillos profundos y se infectó con clones de M13 recombinantes individuales (véase la sección 5.3.5) esencialmente tal como se describe en Wu *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 207: 213-233 (2003). En resumen, se recubrieron pocillos individuales de una inmunoplaaca de Maxisorp de 96 pocillos con 20-500 ng de un anticuerpo de cabra anti-Fab humano, se bloquearon con BSA al 3%/PBS durante 2 h a 37°C y se incubaron con muestras (Fab expresados en periplasma) durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se añadieron 300 ng/pocillo de EphA2 humano-Fc biotinilado durante 1 h a temperatura ambiente. Esto fue seguido por la incubación con conjugado de NeutrAvidin-peroxidasa del rábano (HRP) durante 40 min. a temperatura ambiente. Se detectó la actividad de HRP con sustrato de tetrametil-bencidina (TMB) y se extinguió la reacción con H₂SO₄ 0,2 M. Se leyeron las placas a 450 nm.

5.4.1.2- Resultados del examen primario

De los ~500 clones de la biblioteca A que se examinaron usando 100 ng del reactivo de captura anticuerpo de cabra anti-Fab humano, 14 mostraron una señal significativa (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,2-0,6). Esto correspondió normalmente a una señal al menos 1,3 veces superior a la señal de fondo correspondiente (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,1-0,4) de un anticuerpo irrelevante (MEDI-493; S. Johnson *et al.*, *J. Infect. Dis.* 176: 1215-1224 (1997)). En estas condiciones, Fab 233 mostró una DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,4-0,6.

De los ~200 clones de la biblioteca A que se examinaron usando 20 ng del reactivo de captura anticuerpo de cabra anti-Fab humano, 4 mostraron una señal significativa (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,2-0,4). Esto correspondió normalmente a una señal al menos 2 veces superior a la señal de fondo correspondiente de un anticuerpo irrelevante (DO₄₅₀ de 0,1). En estas condiciones, Fab 233 mostró una DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,2-0,3.

De los ~750 clones de la biblioteca A que se examinaron usando 500 ng del reactivo de captura anticuerpo de cabra anti-Fab humano, 16 mostraron una señal significativa (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,1-0,7). Esto correspondió normalmente a una señal al menos 1,3 veces superior a la señal de fondo correspondiente de un anticuerpo irrelevante (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,06-0,2). En estas condiciones, Fab 233 mostró una DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,1-0,6. Se aislaron los clones V_H-233/V_L-12C8 y V_H-233N_L-8G7 de esta ronda de examen y ambos mostraron una DO₄₅₀ de 0,4 (los valores de DO₄₅₀ de fondo de la misma placa fueron de 0,1 y 0,2, respectivamente; los valores de DO₄₅₀ de Fab 233 de la misma placa fueron de 0,2 y 0,5, respectivamente).

De los ~750 clones de la biblioteca B que se examinaron usando 500 ng del reactivo de captura anticuerpo de cabra anti-Fab humano, 27 mostraron una señal significativa (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,3-2,8). Esto correspondió normalmente a una señal al menos 1,3 veces superior a la señal de fondo correspondiente de un anticuerpo irrelevante (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,2-0,3). En estas condiciones, tanto V_H-233/V_L-12C8 como V_H-233/V_L-8G7 mostraron valores de DO₄₅₀ que oscilaban entre 0,2-0,4. Se aislaron los clones V_H-2G6/V_L-12C8, V_H-6H11/V_L-8G7 y V_H-7E8/V_L-8G7 de esta ronda de examen y mostraron una DO₄₅₀ de 2,8, 2,5 y 1,6, respectivamente (los valores de DO₄₅₀ de fondo de la misma placa fueron de 0,3, 0,2 y 0,2, respectivamente, los valores de DO₄₅₀ de V_H-233/V_L-12C8 de la misma placa fueron de 0,4, 0,3 y 0,3, respectivamente; los valores de DO₄₅₀ de V_H-233/V_L-8G7 de la misma placa fueron de 0,4, 0,3 y 0,3, respectivamente).

De los ~1150 clones de la biblioteca C que se examinaron usando 500 ng del reactivo de captura anticuerpo de cabra anti-Fab humano, 36 mostraron una señal significativa (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,1-0,3). Esto correspondió normalmente a una señal al menos 1,3 veces superior a la señal de fondo correspondiente de un anticuerpo irrelevante (DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,07-0,1). En estas condiciones, Fab 233 mostró una DO₄₅₀ que oscilaba entre 0,1-0,2.

5.4.1.3- Validación de los clones positivos

En conjunto, volvieron a confirmarse 9 clones de la biblioteca A, 7 clones de la biblioteca B y 0 clones de la biblioteca C en un segundo ensayo ELISA de un único punto, independiente, usando extractos periplásmicos preparados a partir de 15 ml de cultivo bacteriano y 500 ng del reactivo de captura anticuerpo de cabra anti-Fab humano. Específicamente, se caracterizaron adicionalmente dos clones de la biblioteca A (V_H-233N_L-12C8 y V_H-233/V_L-8G7) que se mostraron entre las mayores razones de [DO₄₅₀ específica/DO₄₅₀ de fondo] (que oscilaba entre aproximadamente 15-50) mediante secuenciación de didesoxinucleótidos usando un analizador genómico ABI3000. El análisis de secuencia de ADN del clon V_H-233/V_L-12C8 reveló que su cadena pesada contenía una única sustitución de base en la base 104 dando como resultado una sustitución (de N a S) en la posición H35 (numeración de Kabat). Se corrigió esta mutación usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL (Stratagene, La Jolla, CA) según las instrucciones del fabricante. El clon V_H-233/V_L-12C8 corregido mostró una razón de [DO₄₅₀ específica/DO₄₅₀ de fondo] de hasta aproximadamente 50 (similar a V_H-233/V_L-12C8 mutado) lo que indicó la conservación de la unión a EphA2-Fc. Entonces se seleccionaron los clones V_H-233/V_L-12C8 y V_H-233/V_L-8G7 parcialmente humanizados para su caracterización adicional mediante un examen secundario (véase la sección 5.4.2). En la figura 3 se indican las secuencias de V_L-12C8 y V_L-8G7. Tal como se mencionó anteriormente, entonces se incluyeron estas dos cadenas ligeras humanizadas en el diseño de la biblioteca B. Se caracterizaron

adicionalmente tres clones de esta biblioteca que mostraron entre las mayores razones de [DO₄₅₀ específica/DO₄₅₀ de fondo] (aproximadamente 40) mediante secuenciación de didesoxinucleótidos. Esto condujo a la identificación de tres cadenas pesadas humanizadas diferentes (V_H-2G6, V_H-6H11 y V_H-7E8; véase la figura 3). Se encontró que V_H-2G6, V_H-6H11 y V_H-7E8 se emparejaban con V_L-12C8, V_L-8G7 y V_L-8G7, respectivamente. Entonces se seleccionaron estos tres clones completamente humanizados para su caracterización adicional mediante un examen secundario (véase la sección 5.4.2).

5.4.2- Examen secundario

5.4.2.1- Descripción

Con el fin de caracterizar adicionalmente los clones humanizados anteriormente identificados (véase la sección 5.4.1.3), se llevó a cabo un examen secundario usando fragmentos Fab expresados en extractos periplásmicos preparados a partir de 15 ml de cultivo bacteriano. Más precisamente, se usaron dos ensayos ELISA: (i) un ensayo ELISA funcional en el que se recubrieron pocillos individuales de una inmunoplaaca de Maxisorp de 96 pocillos con 500 ng de EphA2 humano-Fc y se bloquearon con BSA al 3%/PBS durante 2 h a 37°C. Entonces se añadieron muestras diluidas en serie 2 veces y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces siguió la incubación con un conjugado de anticuerpo de cabra anti-kappa humana-peroxidasa del rábano (HRP). Se detectó la actividad de HRP con sustrato de TMB y se extinguió la reacción con H₂SO₄ 0,2 M. Se leyeron las placas a 450 nm; (ii) un ensayo ELISA de cuantificación de anticuerpo anti-Fab humano que se llevó a cabo esencialmente tal como se describió. Wu *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 207: 213-233 (2003). En resumen, se recubrieron pocillos individuales de una inmunoplaaca Immulon de 96 pocillos con 100 ng de anticuerpo de cabra anti-Fab humano y después se incubaron con muestras diluidas en serie 2 veces (comenzando a una dilución de 1/25) o patrón (Fab de IgG humana, 500-3,91 ng/ml). Entonces siguió la incubación con un conjugado de anticuerpo de cabra anti-kappa humana-peroxidasa del rábano (HRP). Se detectó la actividad de HRP con sustrato de TMB y se extinguió la reacción con H₂SO₄ 0,2 M. Se leyeron las placas a 450 nm.

5.4.2.2- Resultados del examen secundario

El examen mediante ensayo ELISA secundario en dos partes permitió comparar clones de Fab V_H-233/V_L-12C8, V_H-233N_L-8G7, V_H-2G6/V_L-12C8, V_H-6H11/V_L-8G7 y V_H-7E8/V_L-8G7 entre sí y con el Fab quimérico de mAb B233 (V_H-233/V_L-233) en cuanto a la unión a EphA2 humano. Tal como se muestra en la figura 4, todos los Fab con intercambio de región de entramado conservan la unión a EphA2 humano en comparación con el Fab quimérico de mAb B233. Resulta interesante que algunos clones cuyas cadenas pesada y ligera están ambas humanizadas (V_H-2G6/V_L-12C8 y V_H-7E8/V_L-8G7) muestran una mejor unión aparente a EphA2 humano-Fc que clones en los que sólo las mismas cadenas ligeras están humanizadas (V_H-233/V_L-12C8 y V_H-233/V_L-8G7). Esto indica la existencia de un proceso mediante el cual se seleccionan específicamente las cadenas pesadas humanizadas para una unión óptima al antígeno en el contexto de una cadena ligera humanizada dada. Con el fin de caracterizar adicionalmente las diferentes moléculas completamente humanizadas, entonces se clonaron los clones V_H-2G6/V_L-12C8, V_H-6H11/V_L-8G7 y V_H-7E8/V_L-8G7 así como la forma quimérica de mAb B233 (V_H-233/V_L-233) y se expresaron como IgG1 humana de longitud completa (véase la sección 5.5).

5.5 Clonación, expresión y purificación de las diversas versiones humanizadas de mAb B233 en un formato de IgG1 humana

Se amplificaron mediante PCR las regiones variables de clones con intercambio de región de entramado V_H-2G6, V_H-6H11, V_H-7E8, V_L-12C8 y V_L-8G7 y de V_H-233 y V_L-233 a partir de los vectores de fago de M13 que codificaban para la región V correspondiente usando ADN polimerasa de *pfu*. Entonces se clonaron individualmente en vectores de expresión de mamífero que codificaban para una región no traducida en 5', promotor y potenciador temprano inmediato principal de citomegalovirus humano (hCMVie). M. Boshart, *et al.*, *Cell* 41:521-530 (1985). En este sistema, se secreta una cadena κ humana junto con una cadena κ humana. S. Johnson, *et al.*, *Infect. Dis.* 176: 1215-1224 (1997). Se expresaron transitoriamente los diferentes constructos en células de riñón embrionario humano (HEK) 293 y se recogieron 72 horas tras la transfección. Se purificaron las IgG1 humanas solubles, secretadas, a partir de los medios condicionados directamente en columnas de proteína A o proteína G HiTrap de 1 ml según las instrucciones del fabricante (APBiotech, Inc., Piscataway, NJ). Se recuperaron IgG1 humanas purificadas (normalmente homogeneidad >95%, según se evalúa mediante SDS-PAGE) en rendimientos que variaron entre 2-13 μ g/ml de medios condicionados, se dializaron frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS), se congelaron súbitamente y se almacenaron a -70°C.

5.6 Análisis BIAcore de la unión de IgG de mAb B233 y quiméricas, con intercambio de región de entramado, a EphA2-Fc

Se monitorizó la interacción de IgG solubles de V_H-2G6/V_L-12C8, V_H-6H11/V_L-8G7, V_H-7E8/V_L-8G7 y V_H-233/V_L-233 así como de mAb B233 con EphA2-Fc inmovilizada mediante la detección de resonancia del plasmón superficial usando un instrumento BIAcore 3000 (Farmacia Biosensor, Uppsala, Suecia). Se acopló EphA2-Fc a la matriz de dextrano de un chip sensor CM5 (Farmacia Biosensor) usando un kit de acoplamiento de amina tal como se

describió (B. Johnsson *et al.*, Anal. Biochem. 198: 268-277 (1991)) a una densidad en superficie de entre 105 y 160 UR. Se diluyeron las IgG en HEPES 0,01 M pH 7,4 que contenía NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y P₂O al 0,005%. Se realizaron todas las diluciones posteriores en el mismo tampón. Se realizaron todos los experimentos de unión a 25°C con concentraciones de IgG que oscilaron normalmente entre 100 nM y 0,2 nM a una velocidad de flujo de 75 µl/min.; se recogieron datos durante aproximadamente 25 min. y se usó un pulso de 1 min. de NaCl 1 M, NaOH 50 mM para regenerar las superficies. También se hicieron fluir las IgG sobre una célula no recubierta y se restaron los sensogramas de estas ejecuciones en blanco de los obtenidos con chips acoplados a EphA2-Fc. Se ajustaron los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1. Este algoritmo calcula tanto la k_{on} como la k_{off} , a partir de lo cual se deduce la constante de disociación en equilibrio aparente, K_D , como la razón de las dos constantes de velocidad (k_{off}/k_{on}). En la tabla 66 se indican los valores obtenidos.

Tabla 66. Mediciones de afinidad para la unión de diferentes IgG a EphA2 humano-Fc^a

Constante de anticuerpo (K_D) ^c	Velocidad de asociación (k_{on}) ^b (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Velocidad de disociación (k_{off}) ^b (s ⁻¹)	Disociación (nM)
B233 (murino)	2,8 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁻⁴	0,4
V _H B233N _L -B233 (quimérico)	2,4 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁻⁵	0,3
V _H -2G6/V _L -12C8 (humanizado)	6,4 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁻⁴	3,0
V _H -6H11/V _L -8G7 (humanizado)	9,6 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁻⁴	1,9
V _H -7E8/V _L -8G7 (humanizado)	9,3 x 10 ³	4,5 x 10 ⁻⁴	48

^a Se llevaron a cabo mediciones de afinidad mediante análisis BIAcore tal como se indicó en la descripción del método. ^b Los parámetros cinéticos representan el promedio de 5-18 medidas individuales. ^c La K_D se calculó como razón de las constantes de velocidad (k_{off}/k_{on}).

5.7- Análisis de las variantes con intercambio de región de entramado

5.7.1- Análisis de secuencias

En conjunto, se encontró que dos cadenas ligeras humanizadas únicas (V_L-12C8 y V_L-8G7) y tres cadenas pesadas humanizadas únicas (V_H-2G6, V_H-6H11 y V_H-7E8) soportaban una unión eficaz a EphA2 humano-Fc. La naturaleza promiscua de la cadena ligera humanizada V_L-8G7 se destaca por su capacidad para mediar en la unión productiva en el contexto de dos cadenas pesadas diferentes (V_H-7E8 y V_H-6H11). Todas estas variantes humanizadas mostraron un alto nivel de identidad de aminoácidos global con respecto a mAb B233 en las regiones de entramado correspondientes, que oscilaba entre el 76-83% para las cadenas pesadas y entre el 64-69% para las cadenas ligeras (figura 5). Esto puede explicarse por el hecho de que es más probable que las regiones de entramado humanas de alta homología conserven residuos clave originales. El análisis de regiones de entramado individuales reveló un intervalo más amplio de diferencias, que osciló entre el 48% para la primera región de entramado de V_L-12C8 y el 91% para la cuarta región de entramado de V_H-2G6, V_H-6H11 y V_H-7E8.

Resulta interesante que la cadena pesada humanizada V_H-7E8 consistía exclusivamente en regiones de entramado humanas que eran una correspondencia perfecta con secuencias de línea germinal de región de entramado humana (figura 5). Las cadenas pesadas humanizadas V_H-6H11 y V_H-2G6 contenían una y dos regiones de entramado humanas, respectivamente, que mostraron una correspondencia casi perfecta con las secuencias de línea germinal de región de entramado humana más relacionadas (figura 5). Las diferencias representaron un máximo de tres residuos por cadena (V_H-2G6) y dos residuos por región de entramado (primera región de entramado de V_H-2G6). En ningún caso codificaron estas diferencias para aminoácidos que no se encontraran en otras secuencias de línea germinal de región de entramado humana más distantes. Por tanto, puede decirse que estos clones también pueden denominarse "completamente humanizados". Las cadenas ligeras humanizadas V_L-12C8 y V_L-8G7 contenían una y tres regiones de entramado humanas, respectivamente, que mostraron una correspondencia casi perfecta con las secuencias de línea germinal de región de entramado humana más relacionadas (figura 5). El número de diferencias representó un máximo de tres residuos por cadena (V_L-8G7) y un residuo por región de entramado (primera, segunda y cuarta región de entramado de V_L-8G7; cuarta región de entramado de V_L-12C8). Sin embargo, una vez más, los residuos en estas posiciones también se encontraron en otras secuencias de entramado humanas menos homólogas; por tanto estas variantes también pueden denominarse completamente humanizadas. Dado que estas diferencias no se incorporaron dentro de las presentes bibliotecas, se atribuye su origen a una combinación de factores tales como fidelidad de PCR y/o calidad de oligonucleótidos.

5.7.2- Análisis de unión

Merece la pena observar que sólo un procedimiento de humanización en dos etapas en el que se humanizaron sucesivamente las cadenas ligera y pesada de mAb B233 (biblioteca A y B) permitió aislar clones humanizados que conservaban la unión a EphA2 humano-Fc. De hecho, el examen de una biblioteca en la que se humanizaron
5 simultáneamente las cadenas tanto ligera como pesada (biblioteca C) no permitió recuperar moléculas que mostraran una unión detectable a este antígeno. Esto refleja probablemente factores tales como calidad de biblioteca inferior a la óptima, toma de muestras de biblioteca incompleta y/o expresión procariota ineficaz de una porción de la biblioteca. Se anticipa que el examen de un número mayor de clones habría dado como resultado la identificación de fragmentos de anticuerpo humanizado que conservaran unión a EphA2 humano.

10 Tal como se espera a la vista de sus regiones variables de cadenas pesada y ligera idénticas, mAb B233 original y su versión de IgG quimérica mostraron una constante de disociación prácticamente idéntica ($K_D = 0,4$ y $0,3$ nM, respectivamente; tabla 66). Los clones humanizados V_H-6H11/V_L-8G7 y V_H-2G6/V_L-12C8 , cuando se presentaron en formato de IgG1 humana, mostraron avideces hacia EphA2 humano que fueron similares a la versión original y
15 quimérica de mAb B233 ($K_D = 1,9$ y $3,0$ nM, respectivamente; tabla 66). Esto correspondió a una pequeña disminución de la avidez de 6 y 10 veces, respectivamente, en comparación con mAb B233 original. El clon humanizado V_H-7E8/V_L-8G7 mostró la menor avidez ($K_D = 48$ nM), que correspondió a una mayor disminución de 160 veces en comparación con mAb B233 original. Merece la pena observar que, en cuanto a la fuerza de unión a EphA2-Fc, la clasificación basada en análisis BIAcore de clones de IgG humanizados V_H-6H11/V_L-8G7 , V_H-2G6/V_L-12C8 y V_H-7E8/V_L-8G7 (tabla 66) fue diferente de la clasificación basada en ensayo ELISA que usó sus equivalentes de Fab (figura 4). Esto es particularmente llamativo en el caso del clon V_H-7E8/V_L-8G7 que mostró la menor avidez
20 (tabla 66), pero mostró sistemáticamente la mayor señal mediante valoración ELISA (figura 4). No se sabe lo que explica esta diferencia, pero se piensa que puede atribuirse probablemente al formato de los ensayos y/o a la imprecisión del ensayo ELISA de cuantificación. Alternativamente, es posible que esta discrepancia refleje correlaciones únicas, específicas de clones, entre afinidad (según se mide en la figura 4) y avidez (según se mide en la tabla 66). De hecho, las mediciones de unión bivalentes individuales dependen de diversos factores tales como las disposiciones espaciales particulares de los sitios de unión a antígeno correspondientes o de la distribución en superficie del antígeno local (D.M. Crothers, *et al.* *Immunochemistry* 9: 341-357(1972); K.M. Müller, *et al.*, *Anal. Biochem.* 261: 49-158(1998)).
25

REIVINDICACIONES

1. Método de generación de una biblioteca combinatoria que comprende una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena pesada humanizadas, produciéndose cada una de dichas secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables de cadena pesada humanizadas fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena pesada humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena pesada de anticuerpo donador no humano y cada secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado de cadena pesada es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena pesada humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales.

2. Método de generación de una biblioteca combinatoria que comprende una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena ligera humanizadas, produciéndose cada una de dichas secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables de cadena ligera humanizadas fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena ligera y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena ligera humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena ligera de anticuerpo donador no humano y cada secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado de cadena ligera es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena ligera humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales.

3. Método de generación de una biblioteca combinatoria que comprende: (i) un primer conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena pesada humanizadas, produciéndose cada una de dicho primer conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena pesada humanizadas fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena pesada humana, y (ii) un segundo conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena ligera humanizadas, produciéndose cada una de dicho segundo conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican para regiones variables de cadena ligera humanizadas fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena ligera y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena ligera humana, en el que las CDR de región variable de cadena pesada se derivan de una región variable de cadena pesada de anticuerpo donador no humano, las CDR de región variable de cadena ligera se derivan de una región variable de cadena ligera de anticuerpo donador no humano, cada secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado de cadena pesada humana es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena pesada humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales y cada secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado de cadena ligera humana es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena ligera humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales.

4. Método según la reivindicación 1, 2 ó 3, que comprende además introducir la biblioteca combinatoria de secuencias de nucleótidos en una población de células.

5. Método de producción de un anticuerpo humanizado que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, comprendiendo dicho método: (a) sintetizar una pluralidad de secuencias de polinucleótido que comprenden cada

una una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena pesada humanizada, produciéndose dicha secuencia de nucleótidos fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena pesada humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena pesada de anticuerpo donador no humano que se une inmuno-específicamente a dicho antígeno y cada secuencia de ácido nucleico de región de entramado de cadena pesada es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena pesada humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales; (b) introducir las secuencias de polinucleótido en una población de células que contienen cada una una secuencia de polinucleótido que codifica para una región variable de cadena ligera; y (c) expresar las secuencias de polinucleótido que codifican para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

6. Método de producción de un anticuerpo humanizado que se une inmuno-específicamente a un antígeno, comprendiendo dicho método: (a) sintetizar una pluralidad de secuencias de polinucleótido que comprenden cada una una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena ligera humanizada, produciéndose dicha secuencia de nucleótidos fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena ligera y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena ligera humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena ligera de anticuerpo donador no humano que se une inmuno-específicamente a dicho antígeno y cada secuencia de ácido nucleico de región de entramado de cadena ligera es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena ligera humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales; (b) introducir las secuencias de polinucleótido en una población de células que contienen cada una una secuencia de polinucleótido que codifica para una región variable de cadena pesada y (c) expresar las secuencias de polinucleótido que codifican para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

7. Método de producción de un anticuerpo humanizado que se une inmuno-específicamente a un antígeno, comprendiendo dicho método: (a) sintetizar una pluralidad de primeras secuencias de polinucleótido que comprenden cada una una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena pesada humanizada, produciéndose dicha secuencia de nucleótidos fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena pesada, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena pesada humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena pesada humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena pesada de anticuerpo donador no humano que se une inmuno-específicamente a dicho antígeno y cada secuencia de ácido nucleico de región de entramado de cadena pesada es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena pesada de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales; (b) sintetizar una pluralidad de segundas secuencias de polinucleótido que comprenden cada una una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena ligera humanizada, produciéndose dicha secuencia de nucleótidos fusionando entre sí una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 1 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR1 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 2 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR2 de cadena ligera, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 3 de cadena ligera humana, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una CDR3 de cadena ligera y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región de entramado 4 de cadena ligera humana, en el que las CDR se derivan de una región variable de cadena ligera de anticuerpo donador no humano que se une inmuno-específicamente a dicho antígeno y cada secuencia de ácido nucleico de región de entramado de cadena ligera es de un sub-banco que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha región de entramado de cadena ligera humana de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales; (c) introducir las secuencias de ácido nucleico generadas en las etapas (a) y (b) en una población de células; y (d) expresar las secuencias de nucleótidos que codifican para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

8. Método según la reivindicación 5, 6 ó 7, que comprende además, tras la etapa de expresar las secuencias de nucleótidos, la etapa de examinar para seleccionar un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al antígeno.
- 5 9. Método según la reivindicación 5, 6, 7 u 8, que comprende además, antes de la etapa (a), la etapa de generar los sub-bancos de secuencias de región de entramado.
- 10 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el/los sub-banco(s) de región de entramado humana comprende(n) regiones de entramado de secuencias de entramado de línea germinal humana y/o regiones de entramado de secuencias de anticuerpos humanos funcionales en las que se han introducido una o mutaciones.

V_H-233

5' GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCTCTGAGTCTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTCACTTCACTGATTACTCCATGAACGGGTCCGCCAGCCTCCAGGGAAGGCACTTGAGTGGTTGGGTATTATTAGAAACAAGCTAATGATACACACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGATGCCCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTACTGTGTAAGAATACCCTAGGTATCATGCTATGGACTCCGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO. 1773)

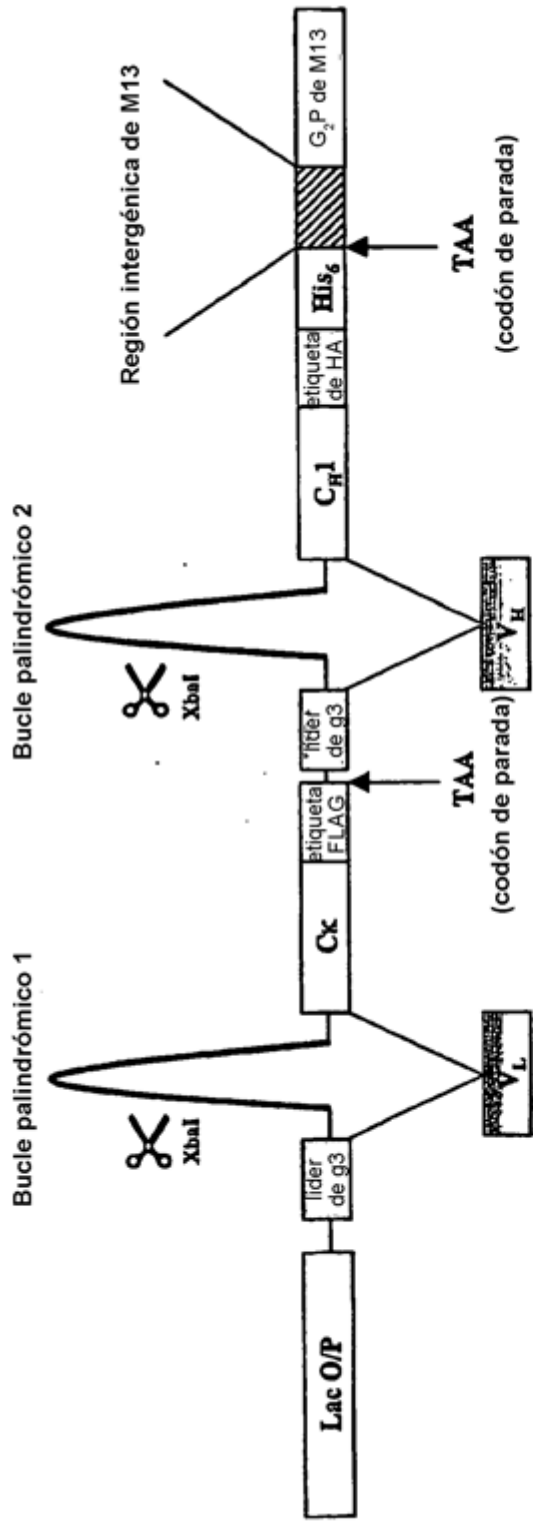
EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYSMNWVRQPPGKALEWLGFIRNKANDYTTEYSASVKG RPTISRDNQSILYLQMNALRAEDSATYYCVRYPHYHANDS WGGTSVTVSS (SEQ ID NO. 1775)

V_L-233

5' GATATGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAATCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGTTTTCCAGTCCATCTCTGGATCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGATGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCCGCTCAGTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA3' (SEQ ID NO. 1774)

DIVLTQSPATLSVTPGDSVNLSCRASQISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYVFQSISSGIPSRFSGSGSDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNWFLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO. 1776)

Figura 1



Secuencia de bucle palindrómico 1: AGGGGGTCTAGAGGGGGTCAAAGACCCCTCTAGACCCCTTTTA
Xba I

Secuencia de bucle palindrómico 2: GATTGCTCTAGAGTGGGACAAAAGTGGCACTCTAGAGCAATCATT
Xba I

Secuencia de etiqueta de HA: CACTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCT
(HYPYDVPDYAS)

Figura 2

Cadenas pesadas

EVKLVEGGGLVQPGGSLRLSCLAASGFTFTDYSMNWVRQPPGKALEWLGFIIRNKANDYTTEYSASVKGGRFTISRDNQSILY 233
 EVQLVEGGGVVVRPGGSLRLSCLAASGFTVSDYSMNWVRQAPGKGLEWIGFIIRNKANDYTTEYSASVKGGRFTISRDDSKNTLY 2G6
 EVQLVEGGGLVQPGGSLRLSCLAASGFTFSDYSMNWVRQAPGKGLEWVAFIIRNKANDYTTEYSASVKGGRFTISRDNKNTLY 6H11
 EVQLVEGGGLVKPGGSLRLSCLAASGFTFSDYSMNWVRQASGKGLEWVGFIRNKANDYTTEYSASVKGGRFTISRDDSKNTLY 7B8

LQMNALRAEDSATYYCVRYPYRHAMDSNGQGTSTVTVSS 233
 LQMNSLKTEDTAVYYCTIYPYRHAMDSNGQGTMTVTVSS 2G6 (SEQ ID NO. 1777)
 LQMNSLRAEDTAMYYCARYPYRHAMDSNGQGTLVTVSS 6H11 (SEQ ID NO. 1778)
 LQMNSLKTEDTAVYYCTIYPYRHAMDSNGQGTLVTVSS 7B8 (SEQ ID NO. 1779)

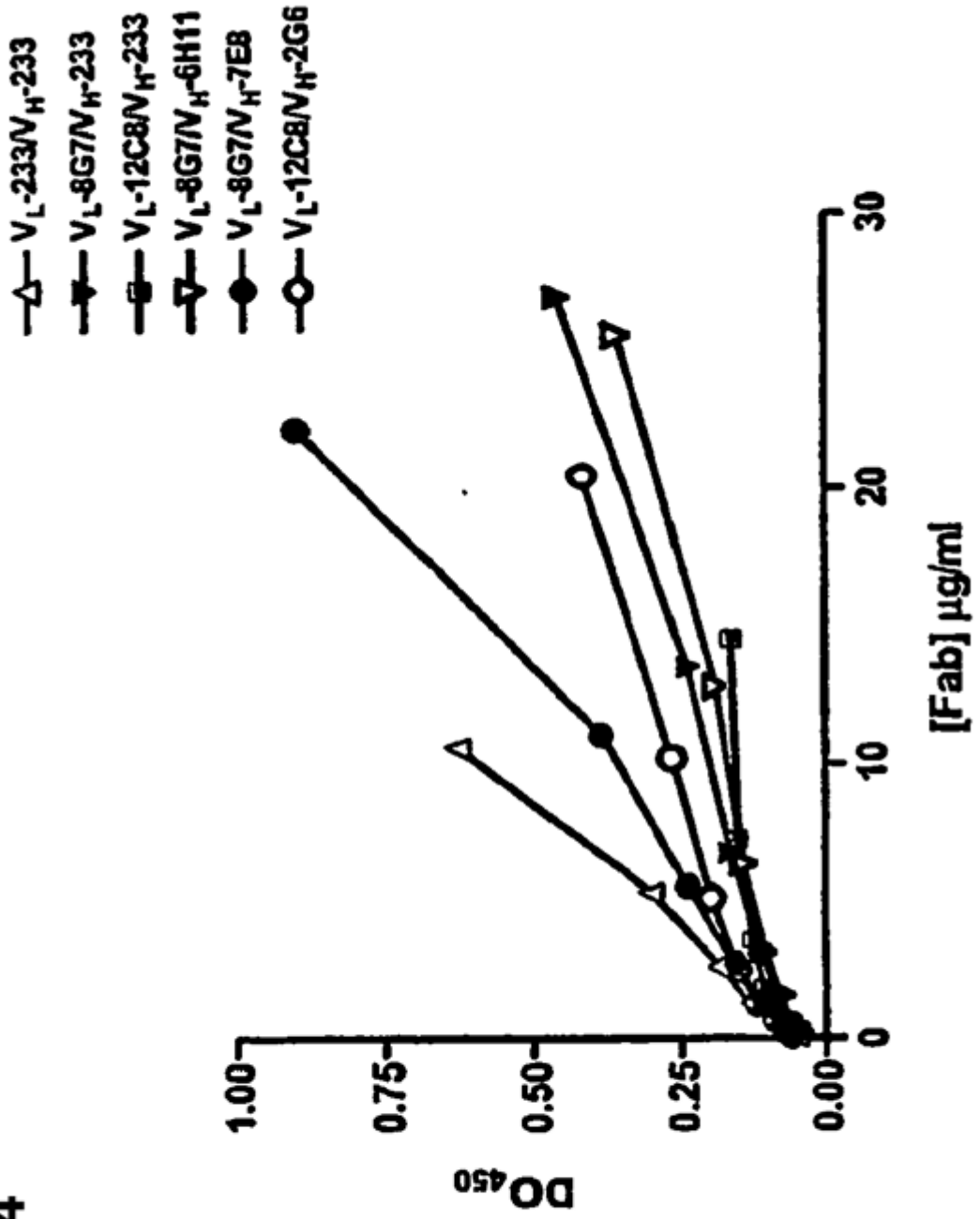
Cadenas ligeras

DIVLTQSPATLSVTPGDSVNLSCRASQISNNLHWYQKSHESPRLLIKYVVFQSSIGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVE 233
 AIQLTQSPSSLSASVGDRTTICRASQISNNLHWYLQKPGQSPQLLIYVVFQSSIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ 12C8
 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQISNNLHWYQKPKAPKSLIYVVFQSSIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLB 8G7

TEDFGMYPCQQSNWPLTFGAGTKLELK 233
 PEDFATYYCQQSNWPLTFGGGKLEIK 12C8 (SEQ ID NO. 1780)
 AEDAATYYCQQSNWPLTFGGGKVDIK 8G7 (SEQ ID NO. 1781)

Figura 3

Figura 4



Anticuerpo	Identidad con mAb B233 (%)				Línea germinal de V _H humana más próxima ^c				Línea germinal de V _L humana más próxima ^c				
	FR1 ^a	FR2 ^a	FR3 ^a	FR4 ^a	Global ^b	FRI	FR2	FR3	FR4	FRI	FR2	FR3	FR4
V _H -B233	100	100	100	100	100	VH3-48 [3] ^d	VH3-72 [3] ^{e,f}	VH3-33 [7] ^g	JH3 [1]	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
V _H -2G6	80	79	66	91	76	VH3-20 [2]	VH3-72 [1] ^{e,f}	VH3-15 [0]	JH3 [0]	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
V _H -6H11	90	71	78	91	83	VH3-48 [0] ^f	VH3-30 [0] ^g	VH3-33 [1] ^f	JH4 [0]	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
V _H -7E8	87	71	66	91	77	VH3-21 [0] ^g	VH3-73 [0]	VH3-15 [0]	JH4 [0]	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
V _L -B233	100	100	100	100	100	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	L2 [7] ^{h,f}	A26 [4] ^e	A26 [8] ^{h,f}	Jκ2 [2]
V _L -12C8	48	60	72	80	64	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	L18 [0] ^f	A18 [0] ^{e,f}	L19 [0] ^{e,f}	Jκ4 [1]
V _L -8G7	74	53	75	60	69	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	L2 [1] ^{h,f}	O2 [1] ^{h,f}	A26 [0] ^c	Jκ4 [1]

^aSe calculó la identidad a nivel de aminoácido para cada región de entramado de anticuerpo individual usando el mAb B233 como referencia.
^bSe calculó la identidad a nivel de aminoácido para las cuatro regiones de entramado juntas usando el mAb B233 como referencia. ^cRegiones de entramado de línea germinal humana con la mayor homología con las regiones de entramado de anticuerpo correspondientes. ^dPara cada región de entramado individual, el número de diferencias de aminoácido en comparación con la región de entramado de línea germinal humana más homóloga se indica entre corchetes. ^eExiste al menos otra región de entramado de línea germinal humana de la misma familia que muestra las mismas características de homología. ^fExiste al menos otra región de entramado de línea germinal humana de una familia diferente que muestra las mismas características de homología. FR: Región de entramado. N.A.: No aplicable

Figura 5