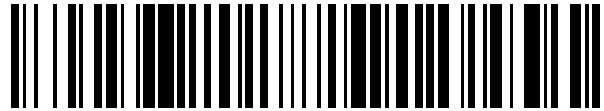


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 051**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)
C40B 50/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2010 E 10722101 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2435568**

54 Título: **Colección de anticuerpos sintéticos para tratar enfermedades**

30 Prioridad:

29.05.2009 US 182350 P
15.06.2009 EP 09162724
29.01.2010 US 299401 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2014

73 Titular/es:

MORPHOSYS AG (100.0%)
Lena-Christ-Strasse 48
82152 Planegg-Martinsried, DE

72 Inventor/es:

ENZELBERGER, MARKUS;
PRASSLER, JOSEF;
URLINGER, STEFANIE;
HERRMANN, TANJA y
TILLER, THOMAS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 511 051 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

Colección de anticuerpos sintéticos para tratar enfermedades

ANTECEDENTES

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

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

30 Un método bien conocido para la identificación de anticuerpos terapéuticos es a través del uso de tecnología de presentación en fagos. La presentación en fagos utiliza partículas similares a virus que se cultivan en bacterias para presentar anticuerpos. Un resumen de los respectivos vectores de presentación en fagos se proporciona en Scott J K, et al: "Phage display: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Una ventaja de esta tecnología es que las genotecas utilizadas son enormes, con un máximo de 1×10^{10} anticuerpos, que se pueden someter a ensayo rápidamente para estudiar la unión a cualquier diana relevante para cualquier enfermedad. Véase, por ejemplo, Knappik et al., (2000), "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides", J. Mol. Biol. 11; 296(1):57-86. El beneficio de trabajar con una cantidad tan grande es que el resultado de un escrutinio en busca de una diana puede dar como resultado cientos de anticuerpos que se unen a la diana terapéutica, pudiendo ser todos ellos terapéuticamente relevantes. Un problema, sin embargo, es que frecuentemente solo unos pocos de estos anticuerpos se pueden desarrollar, es decir, que pueden satisfacer todos los criterios rigurosos requeridos con el fin de que lleguen al mercado.

40 Para que una nueva genoteca de presentación en fagos disminuya rápidamente los plazos de identificación y reduzca los riesgos inherentes, la genoteca debería comprender anticuerpos con propiedades que son necesarias para la selección y el desarrollo clínico y que darán como resultado un tratamiento seguro y eficaz en los pacientes. Tales propiedades incluyen: 1) tasas de presentación en fagos elevadas, de modo que todos y cada uno de los anticuerpos de la colección se pueden someter a ensayo frente a la diana de interés; 2) niveles de expresión elevados, de manera que el anticuerpo o un fragmento se pueden reproducir de manera eficaz; 3) estabilidad térmica elevada, de modo que el anticuerpo puede llegar a los pacientes en una forma efectiva; 4) estabilidad en suero elevada, de manera que el anticuerpo puede sobrevivir en el cuerpo durante un periodo de tiempo terapéuticamente relevante; 5) riesgo de inmunogenicidad reducido, lo que aumenta la seguridad y 5) diversidad elevada, de manera que una genoteca se puede utilizar para identificar anticuerpos contra cualquier diana terapéutica.

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

mune humano.

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

5 Se han iniciado metodologías para evaluar los emparejamientos de genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera variable, prevalentes en el repertorio inmune humano. Véase, de Wildt et al., Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire, *J Mol Biol.* 22;285(3):895-901 (enero de 1999), que se incorpora como referencia en su totalidad. Wildt et al. tomaron muestras de sangre procedentes de donantes humanos, clasificaron los linfocitos B IgG+ que se habían sometido a hipermutación somática, 10 amplificaron mediante PCR los ADNc, secuenciaron cada ADNc y alinearon cada secuencia con los genes conocidos de la línea germinal del dominio variable humano. Wildt et al. observaron que solo unos pocos genes de la línea germinal dominaban el repertorio inmune y que los segmentos de genes de la cadena pesada y ligera expresados frecuentemente, se emparejan con frecuencia.

15 En el documento JP2006197930 se identifican anticuerpos codificados por ciertos genes de la línea germinal, en donde dichos anticuerpos tienen actividad enzimática.

También se han llevado a cabo intentos de conservar los emparejamientos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de linfocitos B individuales. Por ejemplo, se han descrito genotecas de "parejas de cognados" del dominio variable. Véase Meijer et al., Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing, *J Mol Biol.*, 358(3):764-72 (5 de mayo de 2006); y el documento WO2005042774. Se han generado 20 genotecas de acuerdo con las técnicas descritas en Meijer et al. a partir de linfocitos B individuales procedentes de un hospedador inmunizado. Generalmente, los linfocitos B se clasifican, por FACS, de modo que se seleccionan linfocitos B CD38^{HI}, que representan células hipermutadas somáticamente, sus ADNc se amplifican mediante PCR y los productos génicos de los anticuerpos se insertan en vectores Fab para una selección. Tales genotecas de parejas de cognados no están exentas de limitaciones. Por ejemplo, los hospedadores que proporcionan los linfocitos B normalmente están inmunizados; y las poblaciones de linfocitos B clasificadas se han hipermutado, por lo tanto, las 25 genotecas resultantes tienen tendencia hacia un inmunógeno particular.

Además, se han llevado a cabo intentos de utilizar una cadena pesada variable o cadenas ligeras variables destacadas para generar una genoteca. Por ejemplo, en Shi et al., "De Novo Selection of High-Affinity Antibodies from Synthetic Fab Libraries Displayed on Phage as pIX Fusion Proteins"; *J Mol Biol.*, 397(2):385-96 (26 de marzo de 2010) (que no se admite como técnica anterior con respecto a la presente invención), y el documento de la solicitud de patente respectiva WO2009085462; y el documento WO2006014498, secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable se incorporaron en genotecas basándose en su frecuencia de uso en el repertorio inmune humano.

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

Otras metodologías han generado genotecas directamente a partir de linfocitos B o derivadas de los mismos. Por ejemplo, Glanville et al., Precise Determination of the Diversity of a Combinatorial Antibody Library Gives Insight into the Human Immunoglobulin Repertoire, *Proc Natl Acad Sci* 1; 106(48):20216-21 (diciembre de 2009) (que no se admite como técnica anterior con respecto a la presente invención), en donde se describe una genoteca de anticuerpos 45 construida a partir de la diversidad de repertorios de inmunoglobulina M (IgM) de 654 donantes humanos. Específicamente, los ADNc del gen V de la cadena pesada y ligera procedentes de 654 donantes humanos, se amplificaron por separado mediante PCR (separando la pareja de la cadena pesada y ligera variable) y los dominios de la cadena pesada y ligera se reasociaron a continuación aleatoriamente. El documento WO2003052416 describe el aislamiento de linfocitos B a partir de un hospedador que presenta una respuesta pronunciada frente a un patógeno de interés, ya sea como resultado de una infección con un microorganismo o del tratamiento con una vacuna. En el documento WO2003052416, el ADNc que codifica la región CDR3 de las regiones variables se secuenció y se diseñaron fragmentos de anticuerpos que comprendían las CDR3s dominantes. El documento WO2009100896 describe el aislamiento de linfocitos B a partir de un hospedador inmunizado, en donde se secuenciaron los ADNc que codificaban las regiones de la cadena pesada y ligera variable y se determinó la abundancia de las secuencias de la cadena pesada variable y ligera variable sin emparejar. En el documento WO2009100896 (que no se admite que sea técnica anterior con respecto a la presente invención), se sintetizaron genotecas que comprendían las cadenas ligeras variables y pesadas y variables, recombinadas aleatoriamente, en donde los anticuerpos eran específicos de un inmunógeno. Un resumen de estas metodologías y de otras adicionales se encuentra en Fuh et al., Synthetic antibodies as therapeutics, *Expert Opin Biol Ther.* 7(1):73-87 (enero de 2007).

Por lo tanto, existe una gran necesidad de una colección de anticuerpos o de fragmentos de los mismos que incorpore las parejas de genes de la línea germinal pesada variable y ligera variable, expresadas en el repertorio inmune humano que tengan propiedades biofísicas favorables, que conduzcan a anticuerpos que se puedan desarrollar con facilidad, que sean seguros y eficaces en pacientes. Estas y otras necesidades se satisfacen por medio de la presente invención.

COMPENDIO

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

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

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

Además los inventores pensaron que ciertas parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable se pueden expresar de forma diferente en linfocitos B no activados (sin experiencia con antígenos) frente a linfocitos B con experiencia con antígenos, por lo tanto, los datos agrupados se analizaron basándose en el desarrollo o la diferenciación de los linfocitos B sometidos a ensayo. A partir de nuestro análisis, quedó claro que ciertas parejas de genes de la línea germinal se expresan diferencialmente en poblaciones de linfocitos B no activados frente a poblaciones de linfocitos B con experiencia con antígenos.

Como siguiente etapa, se tenía que determinar qué parejas de proteínas de la línea germinal se iban a someter a ensayo, ya que hay ~2500 parejas en el repertorio inmune humano. Una forma sería la de someter a ensayo las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que se presentan de forma más destacada en el repertorio inmune humano, por ejemplo, véase la Tabla 18. Por ejemplo, se podrían seleccionar las mejores cuatrocientas parejas para las pruebas, o seleccionar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable expresadas por encima de cierto umbral de concentración. Esta metodología requeriría la síntesis y el ensayo de un gran número de secuencias de parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable; por lo tanto, esta metodología puede que no fuera muy eficaz.

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

Esta metodología se llevó a cabo de la siguiente manera. Los datos agrupados y datos adicionales (que identificaban únicamente la expresión de VH o VL, no las parejas unidas) se analizaron para determinar la expresión de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable en el repertorio inmune humano. Como siguiente etapa, las secuencias (no parejas) de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable se evaluaron para determinar sus propiedades biofísicas relevantes para el desarrollo. Las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable se evaluaron *in silico* para estudiar las siguientes propiedades: (i) la longitud de CDRs, (ii) el punto isoeléctrico (pI) (el punto isoeléctrico preferido es 8 o superior ya que esto debería proporcionar estabilidad en un tampón de formulación neutro), (iii) modificaciones postraduccionales (PTMs) (específicamente, sitios de glicosilación ligados a N (NxS o NxT) o modificaciones químicas tales como la escisión de Asp (frecuentemente en un DP), (iv) la isomerización de Asp (DD, DG), (v) la desamidación (NS, NG) que puede tener lugar *in vivo* (en suero) o después de un almacenamiento en tampón de formulación y conduce a la pérdida de unión del anticuerpo), (vi) la presencia de metioninas en las CDRs (pueden oxidarse cuando se exponen a un disolvente), (vii) la presencia de cisteínas no apareadas (formarán enlaces disulfuro con cualquier otra cisteína no apareada, lo que conduce a una reticulación de proteínas y/o a niveles de expresión más bajos), (viii) desviaciones de la línea germinal, (ix) la presencia de posibles epítomos de linfocitos T, y (x) la tendencia a una agregación teórica.

Como siguiente etapa las parejas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable que tenían características biofísicas favorables, se combinaron para formar parejas de cadena pesada variable y cadena ligera variable. Este subconjunto de parejas es representativo, reproduce con precisión o incluye la mayoría de las parejas expresadas de manera destacada, procedentes del repertorio inmune humano, tal y como se muestra en la Tabla 23. Esto se hizo sintetizando los genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera variable, combinándolos en parejas, expresando las parejas en forma de proteínas y sometiendo a ensayo cada una para determinar sus propiedades biofísicas. Se analizaron las siguientes propiedades: (i) la tasa de presentación relativa en fagos en el formato Fab, (ii) el nivel de expresión relativa en el formato Fab, por ejemplo, en *E. coli*; (iii) la estabilidad térmica en el formato Fab; (iv) la estabilidad en suero bovino o de ratón en el formato Fab; (v) el nivel de expresión relativa en el formato IgG; (vi) la estabilidad en suero bovino en el formato IgG.

Una vez que se identificaron las parejas de proteínas de la línea germinal que tenían propiedades biofísicas favorables, a continuación se diseñaron colecciones para incluir a estas parejas. Un aspecto de la presente descripción es una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales que comprende las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera variable que tienen propiedades ventajosas que mejoran la capacidad de desarrollo, pero excluye parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera variable que no tienen tales propiedades, incluso si se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. De esta manera, se diseñó la colección para excluir las combinaciones o parejas de la cadena pesada y ligera variable que se producen en la naturaleza (de las 2500 parejas) que carecen de características funcionales ventajosas. Por ejemplo, VH4-34 se presenta con frecuencia en el repertorio inmune humano, tal y como se muestra en la Tabla 20, pero también se sabe que anticuerpos obtenidos a partir de este gen de la línea germinal de la cadena pesada, son citotóxicos para los linfocitos B, por lo tanto, anticuerpos obtenidos a partir de este gen podrían ser excluidos de un diseño de genoteca. Véase Bhat et al., Rapid cytotoxicity of human B lymphocytes induced by VH4-34 (VH4.21) gene-encoded monoclonal antibodies, Clin Exp Immunol., 105(1):183-90 (julio de 1996).

En algunas realizaciones, las presentes colecciones incluyen anticuerpos que comprenden un gran número de combinaciones o parejas de cadena pesada y ligera variable funcionalmente ventajosas, de manera que los anticuerpos de las colecciones son muy diversos, proporcionando de este modo una colección que se puede utilizar para identificar anticuerpos contra cualquier diana terapéutica.

Tales colecciones superan muchos de los problemas de la técnica anterior. Por ejemplo, una genoteca de cognados obtenida a partir de linfocitos B, no incorpora este concepto, ya que los emparejamientos de clase VH y VL presentes en una genoteca de este tipo son idénticos a los emparejamientos de clase presentes en la muestra de linfocitos B. Si se toma una muestra suficientemente grande de linfocitos B, cada una de las combinaciones de emparejamientos de clase con aproximadamente 50 VH y 50 VL (2500) estará presente. El análisis extenso de parejas VH y VL en la presente descripción muestra que muchas de las parejas de genes de la línea germinal VH y VL carecen de propiedades que permitirían la capacidad de desarrollo clínico. Por lo tanto, este tipo de genotecas de cognados comprenden muchas parejas VH y VL que probablemente no puedan desarrollarse. Por lo tanto, puede ser deseable generar genotecas de gran diversidad que comprendan solo las parejas de clase VH y VL que tengan propiedades funcionales ventajosas, pero con una metodología de genoteca de cognados esto no es posible.

Además, en algunas realizaciones, las parejas de genes de la línea germinal comprendidas en la colección se basan en muestras de linfocitos B no activados o de linfocitos B sin experiencia con antígenos, por lo tanto, las parejas de genes de la línea germinal representadas no tienen tendencia hacia un inmunógeno particular y las colecciones pueden ser superiores en el escrutinio contra cualquier inmunógeno.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra los resultados de un ELISA para la expresión Anti-Fd después de la extracción periplásmica de

- 5 un anticuerpo con la cadena pesada VH3-23 (panel superior) y la cadena pesada VH1-69 (panel inferior), siendo portador cada anticuerpo de una de las tres secuencias señal *phoA* modificadas que comprenden los sitios de restricción C-terminales AflII (VLS), NheI (VLA) y AvrII (VLG), en comparación con la secuencia señal de tipo silvestre (TKA). En el grupo de VH3-23, todas las secuencias señal *phoA* modificadas conservan niveles de expresión en el intervalo del tipo silvestre (TKA).
- 10 La **Figura 2** muestra los resultados de un ELISA para la expresión Anti-Fd después de la extracción periplásmica de un anticuerpo con la cadena ligera VK1-39 (panel superior izquierdo), la cadena ligera VK3-11 (panel superior derecho), la cadena ligera VL1-40 (panel inferior izquierdo) y la cadena ligera VL3-1 (panel inferior derecho), siendo portador cada anticuerpo de una de las tres secuencias señal *ompA* modificadas que comprenden los sitios de restricción C-terminales NdeI (AYG), NdeI (AYA) y BsiWI (TYA), en comparación con la secuencia señal de tipo silvestre (AQA). Las secuencias señal *ompA* modificadas que comprenden los sitios de restricción C-terminales y la secuencia señal de tipo silvestre se sometieron a ensayo empleando los fragmentos de Fab V κ y V λ . La secuencia señal que incluye NdeI (AYA) muestra constantemente una expresión tan buena o mejor que la de tipo silvestre (AQA).
- 15 La **Figura 3** muestra los sitios de restricción seleccionados para incorporarlos en el extremo C-terminal de las secuencias señal *phoA* y *ompA* de *E. coli*, tal y como se describe en detalle en los Ejemplos 1-1.3, e incluye las secuencias señal alrededor de CDR 3 y sus respectivas orientaciones. Esta figura, aunque muestra las secuencias señal de *E. coli*, también representa los sitios de restricción C-terminales seleccionados para incorporarlos en las secuencias líder de la cadena pesada humana y la cadena kappa para emplear en la expresión de IgG, tal y como se describe en detalle en el Ejemplo 1.5.
- 20 Las **Figuras 4-9** muestran las parejas de genes de la línea germinal VH/VL de linfocitos B aislados y descritos por Tsuiji M. et al. (2006).
- Las **Figuras 10-12** muestran las parejas de genes de la línea germinal VH/VL de linfocitos B aislados y descritos por Tiller T. et al. (2007).
- 25 Las **Figuras 13-17** muestran las parejas de genes de la línea germinal VH/VL de linfocitos B aislados y descritos por Mietzner B. et al. (2008).
- Las **Figuras 18-20** muestran las parejas de genes de la línea germinal VH/VL de linfocitos B aislados y descritos por Wardemann H. et al. (2003).
- Las **Figuras 21-23** muestran las parejas de genes de la línea germinal VH/VL de linfocitos B aislados y descritos por Yurasov S. et al. (2005).
- 30 Las **Figuras 24-26** muestran las parejas de genes de la línea germinal VH/VL de linfocitos B aislados y descritos por Yurasov S. et al. (2006).
- La **Figura 27** muestra la estrategia de PCR usada para amplificar los ADNc de los linfocitos B no activados maduros (mn) clasificados de forma individual y de células secretoras de anticuerpos (asc) aisladas a partir de un hospedador humano, tal como se describe en detalle en el Ejemplo 2.2.
- 35 Las **Figuras 28-36** muestran las parejas VH/VL de los linfocitos B aislados a partir de una muestra humana, tal como se describe en detalle en el Ejemplo 2.2.
- La **Figura 37** muestra los 20 genes de la línea germinal de VH seleccionados para la síntesis, la combinación y la caracterización funcional, tal y como se describe en detalle en los Ejemplos 4-4.1. La figura también muestra los resultados del análisis *in silico* de cada gen de la línea germinal, en donde pI representa el punto isoeléctrico, PTMs son modificaciones postraduccionales en las regiones determinantes de complementariedad, tal como se describe en el presente documento, NxS/T son sitios de glicosilación ligados a N y Met en CDR son metioninas.
- 40 La **Figura 38** muestra los 8 genes de V λ y 12 de V κ de la línea germinal seleccionados para la síntesis, la combinación y la caracterización funcional, como se describe en detalle en los Ejemplos 4-4.1. La figura también muestra los resultados del análisis *in silico* de cada gen de la línea germinal, en donde pI representa el punto isoeléctrico, PTMs son modificaciones postraduccionales en las regiones determinantes de complementariedad, tal como se describe en el presente documento, NxS/T son sitios de glicosilación ligados a N y Met en CDR son metioninas.
- 45 La **Figura 39** muestra las parejas VH/V κ de los datos agrupados procedentes del Ejemplo 2.1 mostrados en las Figuras 4-26 y del Ejemplo 2.2 mostrados en las Figuras 28-36. Las anotaciones numéricas representan el número de cada pareja de genes VH/V κ de la línea germinal procedente de un linfocito B individual, identificado en los datos agrupados. El eje Y muestra los genes de la línea germinal de VH clasificados de arriba (VH3-23) a abajo (VH3-20) en términos de frecuencia de la expresión en los datos agrupados. El eje X muestra los genes de la línea germinal de V κ clasificados de izquierda (IGKV3-20) a derecha (IGKV1D-17) en términos de frecuencia de la expresión de los datos agrupados. El número 1358 es el número de linfocitos B en la muestra.
- 50 La **Figura 40** muestra las parejas VH/V λ de los datos agrupados procedentes de los Ejemplos 2.1 mostrados en las

Figuras 4-26 y del Ejemplo 2.2 mostrados en las Figuras 28-36. Las anotaciones numéricas representan el número de cada pareja de genes VH/Vλ de la línea germinal procedente de un linfocito B individual, identificado en los datos agrupados. El eje Y muestra los genes de la línea germinal de VH clasificados de arriba (VH3-23) a abajo (VH3-20) en términos de frecuencia de la expresión en los datos agrupados. El eje X muestra los genes de la línea germinal de Vλ clasificados de izquierda (IGLV2-14) a derecha (IGLV4-60) en términos de frecuencia de la expresión de los datos agrupados. El número 779 es el número de linfocitos B en la muestra.

La **Figura 41** muestra las parejas VH/Vκ de los datos agrupados procedentes de los Ejemplos 2.1 mostrados en las Figuras 4-26 y del Ejemplo 2.2 mostrados en las Figuras 28-36, pero incluyendo solo las poblaciones de linfocitos B sin experiencia con antígenos, de linfocitos B inmaduros, nuevos linfocitos B que emigran y linfocitos B maduros no activados, con el fin de identificar las parejas VH/Vκ destacadas en el repertorio inmune humano no activado. Las anotaciones numéricas representan el número de cada pareja de genes VH/Vλ de la línea germinal procedente de un linfocito B individual, identificado en los datos agrupados. El eje Y muestra los genes de la línea germinal de VH clasificados de arriba (VH3-23) a abajo (VH3-20) en términos de frecuencia de la expresión en los datos agrupados. El eje X muestra los genes de la línea germinal de Vκ clasificados de izquierda (IGKV3-20) a derecha (IGKV1D-17) en términos de frecuencia de la expresión de los datos agrupados. El número 888 es el número de linfocitos B en la muestra.

La **Figura 42** muestra las parejas VH/Vλ de los datos agrupados procedentes de los Ejemplos 2.1 mostrados en las Figuras 4-26 y del Ejemplo 2.2 mostrados en las Figuras 28-36, pero incluyendo solo las poblaciones de linfocitos B sin experiencia con antígenos, de linfocitos B inmaduros, nuevos linfocitos B que emigran y linfocitos B maduros no activados, con el fin de identificar las parejas VH/Vλ destacadas en el repertorio inmune humano no activado. Las anotaciones numéricas representan el número de cada pareja de genes VH/Vλ de la línea germinal procedente de un linfocito B individual, identificado en los datos agrupados. El eje Y muestra los genes de la línea germinal de VH clasificados de arriba (VH3-23) a abajo (VH3-20) en términos de frecuencia de la expresión en los datos agrupados. El eje X muestra los genes de la línea germinal de Vλ clasificados de izquierda (IGLV2-14) a derecha (IGLV4-60) en términos de frecuencia de la expresión de los datos agrupados. El número 457 es el número de linfocitos B en la muestra.

La **Figura 43** muestra las parejas VH/Vκ de los datos agrupados procedentes de los Ejemplos 2.1 mostrados en las Figuras 4-26 y del Ejemplo 2.2 mostrados en las Figuras 28-36, pero incluyendo solo las poblaciones de linfocitos B con experiencia con antígenos, de células que secretan anticuerpo IgG y linfocitos B de memoria IgM e IgG. Las anotaciones numéricas representan el número de cada pareja de genes VH/Vκ de la línea germinal procedente de un linfocito B individual, identificado en los datos agrupados. El eje Y muestra los genes de la línea germinal de VH clasificados de arriba (VH3-23) a abajo (VH3-20) en términos de frecuencia de la expresión en los datos agrupados. El eje X muestra los genes de la línea germinal de Vκ clasificados de izquierda (IGKV3-20) a derecha (IGKV1D-17) en términos de frecuencia de la expresión de los datos agrupados. El número 470 es el número de linfocitos B en la muestra.

La **Figura 44** muestra las parejas VH/Vλ de los datos agrupados procedentes de los Ejemplos 2.1 mostrados en las Figuras 4-26 y del Ejemplo 2.2 mostrados en las Figuras 28-36, pero incluyendo solo las poblaciones de linfocitos B con experiencia con antígenos, de células que secretan anticuerpo IgG y linfocitos B de memoria IgM e IgG. Las anotaciones numéricas representan el número de cada pareja de genes VH/Vλ de la línea germinal procedente de un linfocito B individual, identificado en los datos agrupados. El eje Y muestra los genes de la línea germinal de VH clasificados de arriba (VH3-23) a abajo (VH3-20) en términos de frecuencia de la expresión en los datos agrupados. El eje X muestra los genes de la línea germinal de Vλ clasificados de izquierda (IGLV2-14) a derecha (IGLV4-60) en términos de frecuencia de la expresión de los datos agrupados. El número 322 es el número de linfocitos B en la muestra.

Las **Figuras 45A-C** muestran las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes de la línea germinal de VH, como se describen en Tomlinson et al., (1992), "The Repertoire of Human Germline Vh Sequences Reveals about Fifty Groups of Vh Segments with Different Hypervariable Loop" *J. Mol. Biol.* 227, 776-798; Matsuda et al. (1998), "The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus" *J Exp Med* 188(11):2151-62; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes." *Exp Clin Immunogenet.* 18(2):100-16.

Las **Figuras 46A-C** muestran las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes de la línea germinal de Vκ, tal y como se describen en Schåble y Zachau (1993), "The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus," *Biol. Chem Hoppe Seyler.* 374(11):1001-22; Brensing-Küppers et al. (1997), "The human immunoglobulin kappa locus on yeast artificial chromosomes (YACs)" *Gene.* 191(2):173-81; Kawasaki et al. (2001), "Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the Vκ genes" *Eur J Immunol* 31(4):1017-28; y Lefranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes" *Exp Clin Immunogenet.*, 18, 161-174.

Las **Figuras 47A-B** muestran las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes de la línea germinal de Vλ, tal y como se describen en Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" *Genome Research* 7(3):250-61; Fripiat et al., (1995) "Organization of the human immuno-

globulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2" Hum. Mol. Genet., 4, 983-991; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. Exp Clin Immunogenet.; 18:242-254.

La **Figura 48** muestra el vector tricistrónico pJPd1 de presentación en fagos.

La **Figura 49** muestra el vector de expresión de Fab pJPx1.

5 La **Figura 50** muestra el vector de expresión de Fab pMx11 (pMORPHX11).

La **Figura 51** muestra el vector de presentación de Fab pMORPH30.

La **Figura 52** muestra el vector de expresión de IgG de cadena pesada variable pJP_h_lgG1f.

La **Figura 53** muestra el vector de expresión de IgG de cadena ligera κ variable pJP_h_lg_kappa.

La **Figura 54** muestra el vector de expresión de IgG de cadena ligera λ variable pJP_h_lg_lambda2.

10 La **Figura 55** muestra las tasas de presentación relativa de Fab para las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL sometidas a ensayo. Los números más elevados indican niveles de presentación superiores.

La **Figura 56** muestra los niveles de expresión relativa de Fab para las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL sometidas a ensayo. Los números más elevados indican niveles de expresión más altos de Fab.

15 La **Figura 57** muestra los datos de estabilidad térmica de las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL sometidas a ensayo en formato Fab. Los números 60 y 70 indican parejas VH/VL que son estables durante 45 min a 60 o 70°C en la implementación sometida a ensayo. El número 4 indica parejas térmicamente inestables y bg indica niveles de expresión reducidos.

La **Figura 58** muestra los datos de estabilidad en suero bovino de las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL sometidas a ensayo en formato Fab. S significa estable y U inestable en las condiciones del ensayo.

20 La **Figura 59** muestra los datos de estabilidad en suero de ratón de las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL sometidas a ensayo en formato Fab. S significa estable y U inestable en las condiciones del ensayo.

La **Figura 60** muestra las tasas de expresión relativa de IgG para las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL sometidas a ensayo. Los números más elevados indican niveles de expresión de IgG más altos.

25 La **Figura 61** muestra los datos de estabilidad en suero de las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL sometidas a ensayo en formato IgG. S significa estable y U inestable en las condiciones del ensayo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

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

Condiciones generales

30 Los términos "alrededor de" o "aproximadamente" en el contexto de valores numéricos e intervalos, se refieren a valores o intervalos que se aproximan o están cercanos a los valores o intervalos citados, de tal manera que la invención se puede llevar a cabo según lo previsto, como teniendo un número o un porcentaje deseado de homología de secuencia, como es evidente para el experto en la materia, a partir de las enseñanzas contenidas en el presente documento. Esto se debe, al menos en parte, a las condiciones de cultivo diferentes y a la variabilidad de los sistemas biológicos. Por lo tanto, estos términos abarcan valores más allá de los que resultan del error sistemático. Estos términos hacen explícito lo que está implícito. Por lo general, "aproximadamente" incluye $\pm 10\%$ del valor declarado. El término "aproximadamente" se puede utilizar, por tanto, para describir un intervalo.

40 Todos los intervalos expuestos en el presente documento en el resumen y la descripción de la invención incluyen todos los números o valores alrededor de o entre los números del intervalo. Los intervalos de la invención denominan de manera expresa y exponen todos los números enteros, decimales y valores fraccionarios en el intervalo.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indique, los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan en esta memoria de forma intercambiable.

45 El término "tratamiento" incluye la administración de composiciones o anticuerpos para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, aliviando los síntomas o deteniendo o inhibiendo un mayor desarrollo de la enfermedad, la afección o el trastorno. Por lo tanto, tratar incluye pero no se limita a "curar". El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad, o pa-

ra prevenir o ralentizar la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o la supresión terapéutica o el alivio de síntomas después de la manifestación de la enfermedad.

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

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

Anticuerpos y sus propiedades

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

20 La expresión "fragmento funcional del mismo" tal y como se usa en el presente documento, incluye cualquier fragmento que se une a antígeno, tal como Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv, cadenas únicas que incluyen una porción Fc, nanocuerpos y otras estructuras similares a anticuerpos que tienen entramados distintos que las regiones estructurales variables. La expresión "fragmento funcional del mismo" incluye, pero no se limita a cualquier porción funcional de un anticuerpo, en donde la función incluye la unión de un inmunógeno o una función efectora.

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

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

40 Las expresiones "bloque cruzado", "bloqueado de manera cruzada" y "de bloqueo cruzado" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a la capacidad de un anticuerpo u otro agente de unión para interferir en la unión de otros anticuerpos o agentes de unión con la misma diana en un ensayo de unión competitiva, convencional. La capacidad o el grado con el que un anticuerpo u otro agente de unión es capaz de interferir en la unión de otro anticuerpo o molécula de unión con la misma diana, y por lo tanto, si puede decirse con bloqueo cruzado de acuerdo con la invención, se puede determinar utilizando ensayos de unión competitiva convencionales. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, utilizando el instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el grado de las interacciones, utilizando tecnología de resonancia de plasmón de superficie. Otro ensayo para la medición del bloqueo cruzado utiliza una metodología basada en ELISA.

50 El término "epítipo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten habitualmente en agrupaciones en la superficie, químicamente activas, de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

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

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

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

La expresión "secuencia de proteínas de la línea germinal" significa a) la secuencia de aminoácidos de una región variable de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, codificada por un gen de la línea germinal, b) la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos modificada que codifica una región variable de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una región variable de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo codificada por un gen de la línea germinal, en donde la secuencia de ácidos nucleicos está modificada, por ejemplo, mediante la optimización de codones, la adición de sitios de restricción deseados, un contenido optimizado en GC, la eliminación de sitios de corte y empalme no deseados o la eliminación de motivos de inestabilidad del ARNm, o c) una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de la línea germinal, pero con mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos, tales como, con el fin de eliminar una cisteína no deseada, o la introducción de sitios de restricción deseados, por ejemplo BbsI, o que es el resultado de errores en la síntesis, la amplificación o la clonación.

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

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

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

a) para VH: secuencia líder (phoA modificada que incorpora un sitio NheI RE como se muestra en la Figura 3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio BssHII RE como se muestra en la Fig. 3); CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) del anticuerpo 4D5 como se emplea en Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y JH4 FR4 (que incorpora un sitio XhoI/Sall RE como se muestra en la Fig. 3);

b) para Vk: secuencia líder (ompA que incorpora el sitio NdeI RE como se muestra en la Fig. 3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio BbsI RE como se muestra en la Fig. 3), CDR-L3 similar a kappa (QQHYTTPPT) de acuerdo con Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y JK1 FR4 (que incorpora un sitio KpnI RE como se muestra en la Fig. 3); y

c) para VL: secuencia líder (ompA que incorpora el sitio NdeI RE como se muestra en la Fig. 3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorporan un sitio BbsI RE como se muestra en la Fig. 3), CDR-L3 similar a lambda (QSYDSSLGTVV) de acuerdo con Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y la JI2/3 FR4 (que incorpora un sitio KpnI RE como se muestra en la Fig. 3).

Cada una de estas estructuras artificiales se sintetizaron, se expresaron y se sometieron a ensayo como Fab e IgG, tal como se describe en los Ejemplos 6 y 7 para estudiar las siguientes propiedades funcionales: a) presentación relativa después de la producción en fagos y ELISA de fagos en formato Fab; b) niveles de expresión relativa de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis de las células de *E. coli* y detección con ELISA de Fab producido; c) 5 termostabilidad de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis de las células de *E. coli* y detección con ELISA de Fab sin desnaturalizar después de incubar a temperaturas elevadas; d) estabilidad en suero bovino/ratón de Fab procedente de lisados de *E. coli* mediante detección con ELISA de Fab sin desnaturalizar después de la incubación en suero bovino/ratón; e) niveles de expresión relativa de IgG1 humana después de la producción de IgG1 en células de mamíferos y detección con ELISA de IgG1 secretada a partir de material sobrenadante de cultivos celulares; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 humana mediante detección con ELISA de Fab sin desnaturalizar 10 después de la incubación en suero bovino/ratón.

La expresión "secuencia de proteínas sustancialmente de la línea germinal" significa una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de la línea germinal, pero con mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos, como con el fin de eliminar una cisteína no deseada o la introducción de sitios de restricción deseados, por ejemplo, BbsI, 15 o que es el resultado de errores en la síntesis, la amplificación o la clonación.

Los "genes de la línea germinal" son los ácidos nucleicos de los genes de la línea germinal que codifican anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos descritos en las siguientes publicaciones, para VH: Tomlinson et al., (1992), "The Repertoire of Human Germline Vh Sequences Reveals about Fifty Groups of Vh Segments with Different Hypervariable Loop" J. Mol. Biol. 227, 776-798; Matsuda et al. (1998), "The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus" J Exp Med 188(11):2151-62; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes." Exp Clin Immunogenet. 18(2):100-16; para VA: Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" Genome Research 7(3):250-61; Fripiat et al., (1995) "Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2" Hum. Mol. Genet., 4, 983-991; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. Exp Clin Immunogenet.;18:242-254; y para Vκ: Schåble y Zachau (1993), "The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus", Biol. Chem Hoppe Seyler. 374(11):1001-22; Brensing-Küppers et al. (1997), "The human immunoglobulin kappa locus on yeast artificial chromosomes (YACs)" Gene. 191(2):173-81; Kawasaki et al. (2001), "Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the Vκ genes" Eur J Immunol 31(4):1017-28; y LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes" Exp Clin Immunogenet., 18, 161-174, los cuales se incorporan todos en esta memoria como referencia en su totalidad. 20 25 30

Las secuencias de JH4 para regiones de la cadena pesada variable, de Jκ1 para la cadena ligera variable κ, y de JλA2/3 para regiones de la cadena ligera variable λ se describen en las siguientes publicaciones: Scaviner et al., (1999), "Protein displays of the human immunoglobulin heavy, kappa and lambda variable and joining regions" Exp Clin Immunogenet. 16(4):234-40; para JH: Ravetch et al., (1981), "Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes". Cell 27 (3 pt 2): 583-91; para JK: Hieter et al. (1982), "Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes". J Biol Chem 257(3):1516-22; para JL: Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" Genome Research 7(3):250-61. La secuencia de JH4 es (YFDYWGGTTLTVSS); la secuencia de Jκ1 es (WTFGQGTKVEIK); y la secuencia de Jλ2/3 es (VVFGGGTKLTVL). 35 40

La expresión "uso de aminoácidos dependiente de la posición" se refiere a la probabilidad de aparición de una secuencia de aminoácidos particular en una posición dada en un polipéptido. En la presente invención, el uso de aminoácidos dependiente de la posición se determinó para las secuencias de aminoácidos reorganizadas, clasificadas por el gen de la línea germinal individual. Esto permite el diseño preciso e individual de una CDR en su contexto de línea germinal natural. 45

La expresión "dominio/región variable (VH o VL)" significa la región de una inmunoglobulina que comprende uno o varios dominios de Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los ácidos nucleicos de VL (incluyendo Vκ y Vλ), VH, JL (incluyendo Jκ y Jλ) y JH que componen los loci genéticos de inmunoglobulina de cadena ligera (incluyendo κ y λ) y de cadena pesada, respectivamente. Una región variable de cadena ligera o pesada (VL y VH) se compone de una región "estructural" o "FR" intercalada con tres regiones hipervariables denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDRs". La extensión de la región estructural y las CDRs se ha definido con precisión (véase Kabat, 1991, J. Immunol., 147, 915-920; Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883; Al-Lazikani y col, 1997, J. Mol. Biol. 273: 927-948). Las regiones estructurales de un anticuerpo, es decir, las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirven para colocar y alinear las CDRs, que son principalmente responsables de la unión a un antígeno. 50 55

La expresión "región estructural" significa un dominio variable de anticuerpo tal como se define en Kabat et al. (1991) como la parte del dominio variable que sirve como entramado para los bucles de unión al antígeno de este dominio variable. Ejemplos de las regiones estructurales incluyen FR1, FR2, FR3 y FR4 de cualquiera de las cadenas ligera variable o pesada variable. 60

La expresión "región determinante de la complementariedad" o "CDR" significa bucles de unión a antígeno de un an-

ticuerpo, tal como se definen en Kabat et al. (1991). Cada uno de los dos dominios variables de un fragmento Fv de anticuerpo contiene tres CDRs. Las regiones determinantes de complementariedad incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de cualquiera de las cadenas ligera variable o pesada variable.

5 La "pareja de clase VH y VL preferida" significa aquellas parejas de clase VH y VL que se prefieren en un repertorio inmune, por ejemplo, el repertorio inmune humano de acuerdo con un conjunto de criterios umbrales. Por ejemplo, las parejas VH-VL que son abundantes; o que tienen propiedades biofísicas favorables, tales como, una inmunogenicidad baja; estabilidad; se presentan y/o se expresan fácilmente, o parejas VH-VL que aparecen en una concentración de al menos 0,05% en una muestra de ~2500 linfocitos B humanos. Las parejas de clase VH y VL preferidas en el repertorio inmune humano pueden tener características preferidas sobre otras parejas de clase VH y VL.

10 El término "no activado" significa un antígeno sin experiencia.

La expresión "linfocito B no activado" significa un linfocito B, en el que los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos no han sido sometidos a hipermutación somática, por lo tanto, se considera que comprenden los ácidos nucleicos de los genes de la línea germinal, con la aparición de la reordenación del segmento génico V(D)J. Las poblaciones de linfocitos B consideradas no activadas son linfocitos B inmaduros, nuevos linfocitos B que emigran y linfocitos B maduros no activados.

15 La expresión "repertorio inmune humano no activado" significa un repertorio de los ácidos nucleicos aislados a partir de linfocitos B sin experiencia con antígeno, procedentes del sistema inmune de un ser humano, en el que los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, no han sido sometidos a hipermutación somática, por lo tanto, se considera que comprenden los ácidos nucleicos de los genes de la línea germinal, con la aparición de la reordenación del segmento génico V(D)J. Un repertorio puede ser el de un individuo o una población. La presente invención es susceptible de determinar un repertorio inmune a partir de un solo individuo, siempre que se obtengan suficientes linfocitos B. Preferiblemente, el repertorio inmune se obtiene a partir de múltiples individuos para evitar sesgos de la muestra.

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

30 Un "antígeno" y un "inmunógeno" se definen como cualquier molécula que está unida específicamente por un anticuerpo.

La expresión "específico de un inmunógeno" significa la asociación específica entre un anticuerpo y una molécula correspondiente.

35 "Diversificación de CDR" o "CDR diversificada" tal y como se usa en el presente documento, es la modificación de secuencias de aminoácidos en las CDRs a través de cualquier método adecuado. Las CDRs son conocidas generalmente por ser las regiones que se unen a inmunógenos, por lo tanto tener colecciones que comprenden miembros que representan una gran diversidad dentro de las CDRs, aumenta la posibilidad de que una colección comprenda anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen especificidad, y propiedades óptimas para cualquier inmunógeno. La diversidad se obtiene variando la composición de aminoácidos de una o varias CDRs. Esto se puede lograr con cualquiera de los métodos conocidos por un experto en la técnica, incluyendo los métodos descritos en el presente documento.

40 Una "colección de ácidos nucleicos sintéticos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos" significa que todos los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o un fragmento del mismo son sintéticos, pero no se refiere a otros ácidos nucleicos, tales como vectores, que pueden estar ligados funcionalmente con tales ácidos nucleicos sintéticos.

45 **Términos utilizados en el contexto de la biología molecular**

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

El término "sintético" describe una molécula que se produce mediante síntesis o se sintetiza.

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

de los mismos.

El término "hospedador" se refiere a cualquier hospedador incluyendo mamíferos, tales como humanos, murinos o roedores, ratones, ratas, ardillas, ardillas listadas, ardillas terrestres, puercoespines, castores, hámsteres, jerbos, cobayas, conejos, perros, gatos, vacas o caballos.

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

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

- 20 La expresión "ligado funcionalmente" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia de promotor o potenciador está ligada funcionalmente a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula hospedadora apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias promotoras reguladoras de la transcripción que se ligan funcionalmente a una secuencia transcrita, son físicamente adyacentes a la secuencia transcrita, es decir, actúan en cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, tales como potenciadores, no necesitan estar físicamente adyacentes o estar situadas en estrecha proximidad a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

- 25 Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "codón optimizado" u "optimización de codones" significa que una secuencia de nucleótidos ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que se prefieren en la célula u organismo productor. La secuencia de nucleótidos optimizada está diseñada genéticamente para conservar la secuencia de aminoácidos codificada originalmente por la secuencia de nucleótidos de partida. Además, la secuencia de nucleótidos se puede diseñar para que esté desprovista completamente o tanto como sea posible de motivos inhibidores, sitios de corte y empalme, motivos de inestabilidad de ARNm y sitios de restricción indeseados. También se puede optimizar el contenido en GC, los sitios de restricción deseados y otros parámetros. Las secuencias se pueden optimizar en la expresión en diferentes hospedadores, incluyendo células bacterianas o eucariotas. Las secuencias de aminoácidos codificados por secuencias de nucleótidos optimizadas también se denominan optimizadas.

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

- 35 Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o varios residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de polipéptido particular incluye también implícitamente variantes de la misma, modificadas de manera conservadora.

- 55 La expresión "variante modificada de forma conservadora" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcional-

mente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos ellos codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos, sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones del ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido, también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es comúnmente el único codón para metionina, y TGG, que es comúnmente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias de polipéptidos, "variantes modificadas de manera conservadora" incluyen sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de polipéptido que dan como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora se suman a variantes polimórficas y no las excluyen, homólogos entre especies y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son entre sí sustituciones conservadoras: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8), Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)). En algunas realizaciones, la expresión "modificaciones conservadoras de la secuencia" se utilizan para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de la unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad sobre una región especificada o, si no se especifica, en toda la secuencia), cuando se comparan y se alinean para tener una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o una región designada según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos), o más preferiblemente sobre una región que tiene una longitud de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos). Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa típicamente como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias del ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias del ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden utilizar parámetros del programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias del ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", tal y como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera entre la variedad de posiciones contiguas seleccionadas a partir del grupo que consiste en 20 a 600, por lo general de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en donde una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia con el mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Una alineación óptima de secuencias para comparar puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el *algoritmo de homología local* de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, mediante la búsqueda con el método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (2003)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; y Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, respectivamente. El programa informático para realizar análisis BLAST está a disposición del público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar parejas de secuencias con alta puntuación (HSPs), identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo, cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul et al., supra). Estos aciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largas que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de alineación acumulativa se pueda incrementar. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleó-

5 tidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para una pareja de residuos que coinciden; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos que no coinciden, siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se emplea una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o varias ali-
 10 neaciones de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) emplea por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915, 1989) alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas.

15 El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:5873-5787, 1993). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia, si la menor probabilidad de suma en una comparación del ácido nucleico del ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

20 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos por peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete del programa informático GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

30 Aparte del porcentaje de identidad de secuencia indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico reacciona inmunológicamente de forma cruzada con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo en sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas, es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación.
 35 Sin embargo, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que se pueden utilizar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

40 La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que tales expresiones pretenden referirse no solo a la célula objeto en particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede ser que de hecho no sea idéntica a la célula progenitora, pero se siguen incluyendo dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal y como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras típicas son procariontas (tales como bacterias, incluyendo pero no limitadas a *E. coli*) o eucariotas (que incluyen levadura, células de mamífero y otras).

45 El término "vector" es para referirse a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que está ligado. Los vectores preferidos son aquellos capaces de una replicación autónoma y/o de la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están ligados funcionalmente se denominan en esta memoria "vectores de expresión". Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales dentro del genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Tales vectores se denominan en esta memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector empleada más comúnmente. Sin embargo,
 60 la invención pretende incluir otras formas de este tipo de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes.

Los vectores incluyen típicamente un replicón procariota que puede incluir un promotor procariota capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) de los homólogos que codifican VH y/o VL en una célula hospedadora bacteriana, tal como *Escherichia coli* transformada con el mismo. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite la unión de una ARN polimerasa y que tenga lugar la transcripción.

5 Las secuencias de promotores compatibles con hospedadores bacterianos se proporcionan típicamente en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN. Ejemplos de tales plásmidos de vectores incluyen pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329, pPL y pKK223, disponibles comercialmente.

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

15 Los sitios de restricción que son "únicos", son sitios de restricción que existen o aparecen solo una vez en una molécula de ácido nucleico dada.

Colecciones y Métodos de Producción y Utilización de las mismas

20 La presente descripción permite colecciones de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que se pueden utilizar en la identificación de un anticuerpo terapéutico contra cualquier diana, en donde los anticuerpos se pueden desarrollar clínicamente y son seguros y eficaces en pacientes. Como antecedente, los inventores asumieron que las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, abundantes en el repertorio inmune humano tienen probablemente propiedades biofísicas favorables que conducirían a un desarrollo más eficaz y a un incremento de la seguridad y la eficacia de los anticuerpos resultantes en pacientes. Cada linfocito B codifica un anticuerpo, y cada anticuerpo comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable. Cada cadena pesada variable y cada cadena ligera variable de un anticuerpo se puede alinear con una secuencia génica de la línea germinal con el fin de determinar el origen del anticuerpo, es decir, a partir de qué gen de la línea germinal se formaron la cadena pesada variable y la cadena ligera variable. Por lo tanto, para cada anticuerpo, se puede decir, que la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden una pareja de genes de la línea germinal, por ejemplo, VH3-23 se empareja con VK1-5. Tales propiedades biofísicas favorables podrían incluir: a) una tasa de presentación relativa elevada en formato Fab; b) niveles elevados de expresión relativa de Fab; c) termoestabilidad de Fab; d) estabilidad en suero bovino/ratón de Fab; e) niveles elevados de expresión relativa de IgG1 humana; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 humana.

35 Con el fin de comprobar la hipótesis de que las parejas de genes de la línea germinal tienen probablemente propiedades biofísicas favorables, la primera etapa fue identificar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, expresadas en el repertorio inmune humano. En algunos aspectos, la presente descripción comprende un método para producir una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende la etapa de obtener datos que comprenden las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, los datos se obtienen a partir de la bibliografía disponible al público que proporciona parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable. En general, en la bibliografía relevante disponible públicamente, se siguieron los siguientes métodos: los linfocitos B se aislaron a partir de donantes humanos, los linfocitos B se clasificaron para determinar su estado de desarrollo o de diferenciación, los ADNc se generaron y se amplificaron representando el ADN que codifica el anticuerpo a partir de cada uno de los linfocitos B, los ADNc se secuenciaron, los ADNc que codificaban la cadena pesada variable y las cadenas ligeras variables se alinearon con las secuencias de genes conocidas de la línea germinal, y se determinó la pareja de genes de la línea germinal a partir de cada linfocito B. En algunas realizaciones, los datos se obtuvieron a partir de la toma de muestras y el aislamiento de linfocitos B humanos, lo que comprendía un método similar al utilizado en la bibliografía. En estos aspectos, el método para producir una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprende la etapa de obtener datos que comprenden las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano; en donde la etapa de obtención comprende además las etapas de aa) aislar linfocitos B humanos a partir de una muestra; ab) generar ADNc a partir de los linfocitos B; ac) amplificar mediante PCR el ADNc procedente de los linfocitos B; ad) secuenciar los productos de la PCR; y ae) identificar los genes de la línea germinal de los productos de la PCR. Ambos conjuntos de datos proporcionaron las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que están presentes en el repertorio inmune humano.

60 Como siguiente etapa, los datos en bruto se agruparon, se analizaron y las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano se clasificaron en términos de nivel de expresión. En estos aspectos, la presente descripción comprende un método para producir una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprende la identificación de las parejas

de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano.

Parejas de genes de la línea germinal expresadas de forma destacada en el repertorio inmune humano

5 A partir de estos datos es evidente que ciertas parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable estaban presentes con mayor frecuencia que otras en el repertorio inmune humano. Ya que se esperaba que estas parejas destacadas tuvieran propiedades biofísicas superiores, los aspectos de la presente invención comprenden colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, obtenidos a partir de las parejas de genes de la línea germinal que son destacadas en el repertorio inmune humano, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, se obtienen a partir de las parejas de genes de la línea germinal que son destacadas en el repertorio inmune humano. En otros aspectos, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos comprenden secuencias de proteínas sustancialmente de la línea germinal, de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. En otros aspectos, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. En algunos aspectos, la colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dichos genes de la línea germinal se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano.

También se describe en esta memoria una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable consisten esencialmente en secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos consisten esencialmente en las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, en donde en algunas realizaciones, una o varias CDRs consisten esencialmente en las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. También se describe en esta memoria, una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos consisten en las parejas de proteínas de la línea germinal que están codificadas por las parejas de proteínas de la línea germinal expresadas de forma destacada en el repertorio inmune humano, en donde en algunas realizaciones una o varias CDRs consisten esencialmente en las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de manera destacada en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, la mayoría o sustancialmente todos los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos de las colecciones comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano.

En algunas realizaciones, las parejas de genes de la línea germinal que son abundantes o se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, se expresan en una concentración de al menos 0,05% en el repertorio inmune humano, al menos 0,09% en el repertorio inmune humano; al menos 0,14% en el repertorio inmune humano; al menos 0,19% en el repertorio inmune humano; al menos 0,23% en el repertorio inmune humano; al menos 0,28% en el repertorio inmune humano; al menos el 0,33% en el repertorio inmune humano; al menos 0,37% en el repertorio inmune humano; al menos 0,42% en el repertorio inmune humano; al menos 0,47% en el repertorio inmune humano; al menos 0,51% en el repertorio inmune humano; al menos 0,56% en el repertorio inmune humano; al menos 0,61% en el repertorio inmune humano; al menos 0,66% en el repertorio inmune humano; al menos 0,70% en el repertorio inmune humano; al menos 0,84% en el repertorio inmune humano; al menos 0,89% en el repertorio inmune humano; al menos 0,94% en el repertorio inmune humano; al menos 1,03% en el repertorio inmune humano; al menos 1,12% en el repertorio inmune humano; al menos 1,17% en el repertorio inmune humano; o al menos 1,26% en el repertorio inmune humano.

Un aspecto adicional de la presente invención es la capacidad de las colecciones para ser útiles en la identificación de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, contra cualquier inmunógeno. Se pensaba que la generación de colecciones con al menos dos parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, proporcionaría una di-

versidad dentro de la colección, sobre todo dentro de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos de la colección, en términos de longitud de CDR y diversidad en las conformaciones o estructuras canónicas. Esto permite que las colecciones de la presente invención sean útiles en la identificación de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno. Por lo tanto, algunos aspectos de la invención comprenden colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden al menos dos parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos tres parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos cuatro parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos cinco parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos seis parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos siete parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos ocho parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos nueve parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos diez parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos once parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos doce parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos trece parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos catorce parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos quince parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos dieciséis parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos dieciocho parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos diecinueve parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos veinte parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 21 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 22 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 23 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 24 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 25 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 26 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 27 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 28 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 29 secuencias de parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 30 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 31 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 32 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 33 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 34 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 35 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 36 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 37 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 38 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 39 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 40 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 41 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 42 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 43 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 44 proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 45 secuencias de parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 46 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 47 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 48 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 49 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; o al menos 50 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de proteínas de la línea germinal expresadas de forma destacada, en donde las parejas de proteínas de la línea germinal se seleccionan a partir deIGHV1-18/IGKV1-05; IGHV1-18 /IGLV2-23; IGHV1-46/IGKV1-09; IGHV1-46/IGKV1-39; IGHV1-46 /IGKV3-15; IGHV1-69*01/IGKV1-05; IGHV3-07/IGKV1-09; IGHV3-07/IGKV1-12; IGHV3-07/IGKV1-27; IGHV3-07/IGKV3-15; IGHV3-07 /IGLV1-47; IGHV3-07 /IGLV2-23; IGHV3-07 /IGLV3-01; IGHV3-11/IGKV1-05; IGHV3-11/IGKV1-06; IGHV3-11/IGKV1-12; IGHV3-11 /IGKV1-16; IGHV3-11/IGKV3-15; IGHV3-11/IGLV1-47; IGHV3-11/IGLV2-23; IGHV3-15/IGKV1-05; IGHV3-15/IGKV1-06; IGHV3-15/IGKV1-09; IGHV3-15/IGKV1-12; IGHV3-15/IGKV1-16; IGHV3-15/IGKV1-27; IGHV3-15/IGKV1-39; IGHV3-15/IGKV3-15; IGHV3-15/IGLV1-40; IGHV3-15/IGLV1-51; IGHV3-15/IGLV2-11; IGHV3-21/IGKV1-06; IGHV3-21/IGKV1-12; IGHV3-21/IGKV1-27; IGHV3-21/IGKV1-39; IGHV3-21/IGLV2-14; IGHV3-21/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV3-1; IGHV3-33/IGKV3-15; IGHV3-33/IGLV2-23; IGHV3-48/IGKV1-27; IGHV3-53/IGKV1-09; IGHV3-53/IGKV1-12; IGHV3-53/IGLV1-51; IGHV3-53/IGLV2-23; IGHV3-53/IGLV3-1; IGHV3-74/IGKV1-06; IGHV3-74/IGKV1-09; IGHV3-74/IGKV1-27; IGHV3-74/IGKV3-15; IGHV3-74/IGLV1-51; IGHV4-04/IGLV2-23; IGHV4-04/IGLV3-1; IGHV4-04/IGLV3-21; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-1; IGHV5-51/IGKV1-09; IGHV5-51/IGLV2-23; IGHV5-51/IGLV3-1; IGHV6-1/IGKV1-06; y IGHV6-1/IGLV2-23, cuyas secuencias se describen en las Figuras 45 A-C, las Figuras 46 A-C y las Figuras 47 A-B.

También se describen en esta memoria colecciones que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que comprenden una o varias parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de genes de la línea germinal que se muestran en la Tabla 18.

También se describe en esta memoria un anticuerpo aislado o un fragmento funcional del mismo, que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable que comprende una FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de genes de la línea germinal, en donde la pareja de genes de la línea germinal se selecciona a partir de las parejas de genes de la línea germinal de la Tabla 18.

Parejas de genes de la línea germinal expresadas de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado

También se contemplaba que ciertas parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable pueden expresarse diferencialmente en linfocitos B no activados (sin experiencia con antígenos) frente a linfocitos B con experiencia con antígenos, por lo tanto, los datos se analizaron basándose en el desarrollo o la diferenciación de los linfocitos B de la muestra. Colecciones que comprenden parejas de proteínas de la línea

germinal de las parejas de genes de la línea germinal expresadas diferencialmente en linfocitos B no activados, pueden ser ventajosas en la selección de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno. Por lo tanto, unos aspectos de la presente descripción comprenden colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, obtenidas a partir de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado, en donde en algunas realizaciones, una o varias regiones estructurales y/o las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, se obtienen a partir de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. En otros aspectos, la descripción se refiere a colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado, en donde en algunas realizaciones, una o varias regiones estructurales y/o regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. En otros aspectos, la presente descripción se refiere a colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado, en donde en algunas realizaciones, una o varias regiones estructurales y/o regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, en donde dichas secuencias de proteínas de la línea germinal comprenden parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde dichas parejas de proteínas de la línea germinal están codificadas por parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado.

También se describe en esta memoria una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable consisten esencialmente en secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos consisten esencialmente en las parejas de proteínas de la línea germinal codificadas por las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. También se describe en esta memoria una colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos consisten en las parejas de proteínas de la línea germinal que están codificadas por las parejas de genes de la línea germinal expresadas de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, la mayoría o sustancialmente todos los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos de las colecciones comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado.

En algunas realizaciones, las parejas de genes de la línea germinal que son abundantes o se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado, se expresan en una concentración de al menos 0,07% en el repertorio inmune humano no activado, al menos 0,15% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,22% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,30% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,37% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,45% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,52% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,59% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,67% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,74% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,82% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,89% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 0,97% en el repertorio inmune humano no activado; al menos 1,19% en el repertorio inmune humano no activado; o al menos 1,56% en el repertorio inmune humano no activado.

Un aspecto adicional de la presente invención es la capacidad de las colecciones para ser útiles en la identificación de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno. Se pensó que la generación de colecciones con al menos dos parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que están codificadas por las parejas de genes de la línea germinal expresadas de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado, proporcionaría una diversidad dentro de la colección, especialmente dentro de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos de la colección, en términos de longitud de CDR y diversidad en las conformaciones o estructuras canónicas. Esto permite que las colecciones de la presente invención sean útiles en la identificación de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno. Por lo tanto, algunos aspectos de la invención comprenden colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden al menos dos parejas de proteínas diferentes de

la línea germinal; al menos tres parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos cuatro parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos cinco parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos seis parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos siete parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos ocho parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos nueve parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos diez parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos once parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos doce parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos trece parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos catorce parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos quince parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos dieciséis parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos diecisiete parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos dieciocho parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos diecinueve parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos veinte parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 21 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 22 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 23 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 24 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 25 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 26 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 27 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 28 proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 29 secuencias de parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 30 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 31 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 32 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 33 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 34 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 35 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 36 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 37 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 38 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 39 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 40 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 41 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 42 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 43 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 44 proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 45 secuencias de parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 46 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 47 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 48 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 49 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; o al menos 50 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal, en donde las parejas de proteínas de la línea germinal se seleccionan a partir de IGHV1-18/IGKV1-05; IGHV1-18 /IGLV2-23; IGHV1-46/IGKV1-09; IGHV1-46/IGKV1-39; IGHV1-46 /IGKV3-15; IGHV1-69*01/IGKV1-05; IGHV3-07/IGKV1-09; IGHV3-07/IGKV1-12; IGHV3-07/IGKV1-27; IGHV3-07/IGKV3-15; IGHV3-07 /IGLV1-47; IGHV3-07 /IGLV2-23; IGHV3-07 /IGLV3-01; IGHV3-11/IGKV1-05; IGHV3-11/IGKV1-06; IGHV3-11/IGKV1-12; IGHV3-11 /IGKV1-16; IGHV3-11/IGKV3-15; IGHV3-11/IGLV1-47; IGHV3-11/IGLV2-23; IGHV3-15/IGKV1-05; IGHV3-15/IGKV1-06; IGHV3-15/IGKV1-09; IGHV3-15/IGKV1-12; IGHV3-15/IGKV1-16; IGHV3-15/IGKV1-27; IGHV3-15/IGKV1-39; IGHV3-15/IGKV3-15; IGHV3-15/IGLV1-40; IGHV3-15/IGLV1-51; IGHV3-15/IGLV2-11; IGHV3-21/IGKV1-06; IGHV3-21/IGKV1-12; IGHV3-21/IGKV1-27; IGHV3-21/IGKV1-39; IGHV3-21/IGLV2-14; IGHV3-21/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV3-1; IGHV3-33/IGKV3-15; IGHV3-33/IGLV2-23; IGHV3-48/IGKV1-27; IGHV3-53/IGKV1-09; IGHV3-53/IGKV1-12; IGHV3-53/IGLV1-51; IGHV3-53/IGLV2-23; IGHV3-53/IGLV3-1; IGHV3-74/IGKV1-06; IGHV3-74/IGKV1-09; IGHV3-74/IGKV1-27; IGHV3-74/IGKV3-15; IGHV3-74/IGLV1-51; IGHV4-04/IGLV2-23; IGHV4-04/IGLV3-1; IGHV4-04/IGLV3-21; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-1; IGHV5-51/IGKV1-09; IGHV5-51/IGLV2-23; IGHV5-51/IGLV3-1; IGHV6-1/IGKV1-06; y IGHV6-1/IGLV2-23, cuyas secuencias se describen en las Figuras 45 A-C, las Figuras 46 A-C y las Figuras 47 A-B.

También se describen colecciones que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que comprenden una o varias parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir de las parejas de genes de la línea germinal que se muestran en la Tabla 19.

También se describe en esta memoria un anticuerpo aislado o un fragmento funcional del mismo, que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable que comprenden una FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal que comprenden una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde la pareja de proteínas de la línea germinal se selecciona a partir de las parejas de genes de la línea germinal de la Tabla 19.

Genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable expresados de forma destacada en el repertorio inmune humano

Como siguiente etapa, los datos agrupados y datos adicionales fueron analizados para determinar la expresión de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable en el repertorio inmune humano. Por lo tanto, aspectos adicionales de la presente invención comprenden métodos para producir una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden la etapa de identificar los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. Una forma de hacer esto es clasificar los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable en función de su nivel de expresión.

Los anticuerpos que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable o la

cadena ligera variable codificadas por los genes de la línea germinal expresados de forma destacada en el repertorio inmune humano tienen probablemente propiedades biofísicas favorables que mejoran el desarrollo, la seguridad y la eficacia en los pacientes. Por lo tanto, unos aspectos de la presente invención se refieren a colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos obtenidas a partir de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, se obtienen a partir de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. También se describen en esta memoria colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. También se describen en esta memoria colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. También se describe en esta memoria una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, en donde dichas secuencias de proteínas de la línea germinal están codificadas por los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano.

En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere a una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable consisten esencialmente en secuencias de proteínas de la línea germinal de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos consisten esencialmente en secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable codificadas por los genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, la presente invención comprende una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos consisten en las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable o la cadena ligera variable codificadas por los genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, la mayoría o sustancialmente todos los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos de las colecciones comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por los genes de la línea germinal que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano no activado.

También se describen en esta memoria, genes de la línea germinal de la cadena pesada variable que son abundantes o se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano, que se expresan en una concentración de al menos 0,1% en el repertorio inmune humano; al menos 0,2% en el repertorio inmune humano; al menos 0,3% en el repertorio inmune humano; al menos 0,4% en el repertorio inmune humano; al menos 0,5% en el repertorio inmune humano; al menos 0,6% en el repertorio inmune humano; al menos 1,0% en el repertorio inmune humano; al menos 1,6% en el repertorio inmune humano; al menos 2,1% en el repertorio inmune humano; al menos 2,2% en el repertorio inmune humano; al menos 2,6% en el repertorio inmune humano; al menos 2,7% en el repertorio inmune humano; al menos 3,0% en el repertorio inmune humano; al menos 3,2% en el repertorio inmune humano; al menos 3,3% en el repertorio inmune humano; al menos 4,0% en el repertorio inmune humano; al menos 4,1% en el repertorio inmune humano; al menos 4,5% en el repertorio inmune humano; al menos 4,6% en el repertorio inmune humano; al menos 5,3% en el repertorio inmune humano; al menos 5,8% en el repertorio inmune humano; al menos 6,8% en el repertorio inmune humano; al menos 7,6% en el repertorio inmune humano; al menos 8,0% en el repertorio inmune humano o al menos 10,6% en el repertorio inmune humano.

También se describen en esta memoria, genes de la línea germinal de la cadena ligera variable que son abundantes o se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano que se expresan en una concentración de al menos 0,1% en el repertorio inmune humano; al menos 0,2% en el repertorio inmune humano; al menos 0,3% en el repertorio inmune humano; al menos 0,4% en el repertorio inmune humano; al menos 0,5% en el repertorio inmune humano; al menos 0,7% en el repertorio inmune humano; al menos 1,0% en el repertorio inmune humano; al menos 1,1% en el repertorio inmune humano; al menos 1,3% en el repertorio inmune humano; al menos 1,9% en el reperto-

rio inmune humano; al menos 2,2% en el repertorio inmune humano; al menos 2,4% en el repertorio inmune humano; al menos 2,6% en el repertorio inmune humano; al menos 4,6% en el repertorio inmune humano; al menos 6,0% en el repertorio inmune humano; al menos 7,6% en el repertorio inmune humano; al menos 8,5% en el repertorio inmune humano; al menos 11,1% en el repertorio inmune humano; al menos 11,2% en el repertorio inmune humano; al menos 14,2% en el repertorio inmune humano; o al menos 16,2% en el repertorio inmune humano.

También se describen en esta memoria, genes de la línea germinal de la cadena ligera λ variable que son abundantes o se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano que se expresan en una concentración de al menos 0,1% en el repertorio inmune humano; al menos 0,3% en el repertorio inmune humano; al menos 0,5% en el repertorio inmune humano; al menos 0,6% en el repertorio inmune humano; al menos 1,0% en el repertorio inmune humano; al menos 1,2% en el repertorio inmune humano; al menos 1,5% en el repertorio inmune humano; al menos 1,7% en el repertorio inmune humano; al menos 4,5% en el repertorio inmune humano; al menos 5,1% en el repertorio inmune humano; al menos 5,3% en el repertorio inmune humano; al menos 6,5% en el repertorio inmune humano; al menos 8,1% en el repertorio inmune humano; al menos 10,0% en el repertorio inmune humano; al menos 11,3% en el repertorio inmune humano; o al menos 18,1% en el repertorio inmune humano.

Un aspecto adicional de la presente invención es la capacidad de las colecciones para ser útiles en la identificación de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno. Se pensó que la generación de colecciones con uno o varios de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable expresados de forma destacada en el repertorio inmune humano, generaría diversidad dentro de la colección, sobre todo en la longitud de la CDR y conformaciones o estructuras canónicas, permitiendo de este modo que la colección fuera útil en la identificación de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno. Se describen adicionalmente colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden al menos dos secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos tres secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos cuatro secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos cinco secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos seis secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos siete secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos ocho secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos nueve secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos diez secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos once secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos doce secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos trece secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos catorce secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos quince secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos dieciséis secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos diecisiete secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos dieciocho secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos diecinueve secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos veinte secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 21 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 22 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 23 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 24 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 25 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 26 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 27 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 28 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 29 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 30 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 31 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 32 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 33 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 34 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 35 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 36 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 37 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 38 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 39 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 40 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 41 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 42 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 43 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 44 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 45 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 46 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 47 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 48 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 49 secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable.

ble seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV4-39; IGHV4-34; IGHV4-59; IGHV1-69; IGHV5-51; IGHV3-7; IGHV1-18; IGHV3-48; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV1-2; IGHV3-33; IGHV4-31; IGHV3-53; IGHV3-11; IGHV3-9; IGHV4-4; IGHV1-46; IGHV3-74; IGHV1-24; IGHV4-61; IGHV1-8; IGHV1-3; IGHV3-49; IGHV3-43; IGHV4-28; IGHV3-64; y IGHV7-81.

5 En algunas realizaciones, las colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable en donde dichas regiones estructurales comprenden una o varias secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena ligera κ variable seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGKV3-20; IGKV1-39/1D-39; IGKV1-5; IGKV3-15; IGKV4-1; IGKV3-11; IGKV2-28/2D-28; IGKV1-33/1D-33; IGKV2-30; IGKV1-9; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-8; IGKV1-16; IGKV1-6; IGKV1-12; IGKV2D-29; IGKV1-13; IGKV1D-8; y IGKV2-24.

10 En algunas realizaciones, las colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable en donde dichas regiones estructurales comprenden una o varias secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena ligera λ variable seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGLV2-14; IGLV1-40; IGLV1-44; IGLV1-51; IGLV2-23; IGLV3-21; IGLV1-47; IGLV3-1; IGLV2-11; IGLV2-8; IGLV6-57; IGLV3-25; IGLV7-46; IGLV1-36; IGLV7-43; IGLV9-49; IGLV4-69; IGLV2-18; IGLV3-10; y IGLV3-27.

15 En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento funcional del mismo, que comprende una FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV4-39; IGHV4-34; IGHV4-59; IGHV1-69; IGHV5-51; IGHV3-7; IGHV1-18; IGHV3-48; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV1-2; IGHV3-33; IGHV4-31; IGHV3-53; IGHV3-11; IGHV3-9; IGHV4-4; IGHV1-46; IGHV3-74; IGHV1-24; IGHV4-61; IGHV1-8; IGHV1-3; IGHV3-49; IGHV3-43; IGHV4-28; IGHV3-64; IGHV7-81; IGKV3-20; IGKV1-39/1D-39; IGKV1-5; IGKV3-15; IGKV4-1; IGKV3-11; IGKV2-28/2D-28; IGKV1-33/1D-33; IGKV2-30; IGKV1-9; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-8; IGKV1-16; IGKV1-6; IGKV1-12; IGKV2D-29; IGKV1-13; IGKV1D-8; IGKV2-24; IGLV2-14; IGLV1-40; IGLV1-44; IGLV1-51; IGLV2-23; IGLV3-21; IGLV1-47; IGLV3-1; IGLV2-11; IGLV2-8; IGLV6-57; IGLV3-25; IGLV7-46; IGLV1-36; IGLV7-43; IGLV9-49; IGLV4-69; IGLV2-18; IGLV3-10; y IGLV3-27.

Genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable que tienen propiedades biofísicas favorables

30 Como siguiente etapa, las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable se evaluaron para determinar sus propiedades biofísicas relevantes para el desarrollo. Las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable se evaluaron *in silico* para estudiar las siguientes propiedades: longitud de CDR, punto isoeléctrico (pI), el punto isoeléctrico preferido es 7,5 o superior, ya que debe proporcionar estabilidad en un tampón de formulación convencional de pH 5,5 a pH 7, modificaciones postraduccionales en las regiones determinantes de complementariedad (PTMs) (concretamente, sitios de glicosilación ligados a N (NxS o NxT) o modificaciones químicas tales como escisión en Asp (frecuentemente en un DP), isomerización en Asp (DD, DG), desamidación (NS, NG) que puede tener lugar *in vivo* (en suero) o después del almacenamiento en tampón de formulación y conduce a una pérdida de la unión del anticuerpo), la presencia de metioninas en las CDRs (se pueden oxidar cuando se exponen a disolvente), la presencia de cisteínas no apareadas (se formarán enlaces disulfuro con cualquier otra cisteína no apareada, lo que conduce a la reticulación de proteínas y/o a niveles de expresión más bajos), desviaciones de la línea germinal, la presencia de posibles epítopos de linfocitos T y una propensión teórica a la agregación.

35 En algunas realizaciones la presente descripción que se refiere a un método para producir la colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprende las etapas de a) identificar las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; y vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5; y b) generar una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprende las secuencias de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable identificadas en a).

45 También se describen en esta memoria colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos obtenidas a partir de las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, se obtienen a partir de las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que tienen ta-

les propiedades.

También se describen en esta memoria colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal de las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal procedentes de las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que tienen tales propiedades.

También se describen en esta memoria colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la proteína de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que tiene tales propiedades.

Unos aspectos de la presente descripción se refieren a colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden cisteínas no apareadas.

Unos aspectos de la presente descripción se refieren a colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; tres modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; dos modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; una modificación postraduccional o menos en las regiones determinantes de complementariedad o ninguna modificación postraduccional en las regiones determinantes de complementariedad.

Unos aspectos de la presente descripción se refieren a colecciones de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos obtenidos a partir de las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden un punto isoeléctrico de al menos 7,5; de al menos 8,0; de al menos 8,5; de al menos 9; o de al menos 9,5.

Unos aspectos de la presente descripción se refieren a colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

También se describen colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden al menos dos de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

En algunos aspectos las colecciones descritas de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden al menos cuatro de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

En algunos aspectos de la presente descripción, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la

cadena ligera variable que comprenden al menos cuatro de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

- 5 En algunos aspectos de la presente descripción, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden al menos cinco de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

- 10 En algunos aspectos de la presente descripción, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; y vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

- 15 En algunos aspectos de la presente descripción, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales consisten esencialmente en secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

- 20 En algunos aspectos de la presente descripción, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, consisten esencialmente en las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden al menos una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

- 25 En algunos aspectos de la presente descripción, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable en donde las regiones estructurales consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

- 30 En algunos aspectos de la presente descripción, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, consisten en las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

- 35 En algunos aspectos de la presente descripción, la mayoría o sustancialmente todos los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos de las colecciones comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

- 40 En algunos aspectos de la presente descripción, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, consisten en las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

Algunos aspectos de la presente descripción se refieren a una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, en donde dichas secuencias de proteínas de la línea germinal comprenden la siguiente propiedad: i) una cisteína o menos no apareada.

Algunos aspectos de la presente descripción se refieren a una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, en donde dichas secuencias de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades: i) una cisteína o menos no apareada; ii) un epítipo o menos de linfocito T potencial.

Algunos aspectos de la presente descripción se refieren a una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, en donde dichas secuencias de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades: i) una cisteína o menos no apareada; ii) un epítipo o menos de linfocito T potencial; y iii) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

Algunos aspectos de la presente descripción se refieren a una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, en donde dichas secuencias de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades: i) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) una cisteína o menos no apareada; iii) un epítipo o menos de linfocito T potencial; y iv) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

Un aspecto adicional de la presente invención es la capacidad de las colecciones para ser útiles en la identificación de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno. Se pensó que la generación de colecciones con uno o varias secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable, generaría diversidad dentro de la colección, especialmente en la longitud de CDR y conformaciones o estructuras canónicas, permitiendo de este modo que la colección fuera útil para identificar anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno.

Algunos aspectos de la presente descripción se refieren a colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden al menos dos secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos tres secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos cuatro secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos cinco secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos seis secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos siete secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos ocho secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos nueve secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos diez secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos once secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos doce secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos trece secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos catorce secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos quince secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos dieciséis secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos diecisiete secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos dieciocho secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos diecinueve secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; o al menos veinte secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable que comprenden las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

Algunos aspectos de la presente descripción se refieren a colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden al menos dos secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos tres secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos cuatro secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos cinco secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos seis secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos siete secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos ocho secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos nueve secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos diez secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos once secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable; al menos doce secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera κ variable, que comprenden las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regio-

nes determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

5 Algunos aspectos de la presente descripción se refieren a colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden al menos dos secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera λ variable; al menos tres secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera λ variable; al menos cuatro secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera λ variable; al menos cinco secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera λ variable; al menos seis secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera λ variable; al menos siete secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera λ variable; al menos ocho secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena ligera λ variable que comprenden las siguientes propiedades: i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad; ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad; iii) una cisteína o menos no apareada; iv) un epítipo o menos de linfocito T potencial; v) una propensión intermedia o baja a la agregación; o vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5.

En algunas realizaciones, las colecciones descritas comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable en donde dichas regiones estructurales comprenden una o varias secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGHV1-2; IGHV1-18; IGHV1-69; IGHV1-46; IGHV3-7; IGHV3-11; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV3-33; IGHV3-48; IGHV3-53; IGHV3-73; IGH3-74; IGHV4-4; IGHV4-31; IGHV4-39; IGHV 5-51 y IGHV6-1.

En algunas realizaciones, las colecciones descritas comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable en donde dichas regiones estructurales comprenden una o varias secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena ligera κ variable seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGKV1-5; IGKV1-6; IGKV1-9; IGKV1-12; IGKV1-16; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-39; IGKV2-30; IGKV3-11; IGKV3-15; y IGKV3-20.

En algunas realizaciones, las colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable en donde dichas regiones estructurales comprenden una o varias secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena ligera λ variable seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGLV1-40; IGLV1-47; IGLV1-51; IGLV2-11; IGLV2-23; IGLV2-14; IGLV3-1 y IGLV3-21.

En algunas realizaciones, la presente invención comprende un anticuerpo aislado o un fragmento funcional del mismo, que comprende una FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGHV1-2; IGHV1-18; IGHV1-69; IGHV1-46; IGHV3-7; IGHV3-11; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV3-33; IGHV3-48; IGHV3-53; IGHV3-73; IGH3-74; IGHV4-4; IGHV4-31; IGHV4-39; IGHV 5-51; IGHV6-1; IGKV1-5; IGKV1-6; IGKV1-9; IGKV1-12; IGKV1-16; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-39; IGKV2-30; IGKV3-11; IGKV3-15; IGKV3-20; IGLV1-40; IGLV1-47; IGLV1-51; IGLV2-11; IGLV2-23; IGLV2-14; IGLV3-1 y IGLV3-21.

Parejas de genes de la línea germinal que tienen propiedades biofísicas favorables

40 Como siguiente etapa, había que determinar qué parejas de proteínas de la línea germinal se iban a someter a ensayo, ya que hay ~2500 parejas en el repertorio inmune humano. Una forma sería someter a ensayo las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que se producen de forma más destacada en el repertorio inmune humano, por ejemplo, véase la Tabla 18. Se podría seleccionar para someter a ensayo, por ejemplo, las cuatrocientos parejas mejores, o seleccionar las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, expresadas por encima de cierto umbral de concentración. Por lo tanto, unos aspectos de la presente descripción comprenden métodos que producen la colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos en donde la etapa de producir comprende además la etapa de identificar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable expresadas en una concentración de al menos 0,05% en el repertorio inmune humano; generar anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden las parejas de proteínas de la línea germinal identificadas; y evaluar las siguientes propiedades de dichas parejas de proteínas de la línea germinal: i) tasa de presentación relativa en formato Fab; ii) nivel de expresión en formato Fab; iii) estabilidad térmica a 60°C o más en formato Fab durante al menos 45 minutos; iv) estabilidad en suero bovino en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) nivel de expresión en formato IgG; y vi) estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

55 Esta metodología requeriría la síntesis y someter a ensayo un gran número de secuencias de parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable; por lo tanto, una metodología de este tipo no sería muy eficaz.

Como metodología alternativa, los inventores seleccionaron un subconjunto de las parejas de la línea germinal de la

cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que es representativo, reproduce con precisión o incluye la mayoría de las parejas expresadas de forma destacada, procedentes del repertorio inmune humano. Esta metodología se basaba, en parte, en la observación de que un pequeño número de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable son dominantes en el repertorio inmune humano. Wildt et al. en 895-896 describen este fenómeno. Wildt et al. también establecen que los segmentos de genes de la cadena pesada y ligera expresados de forma frecuente se emparejan frecuentemente, y observaron que la mitad de los emparejamientos de la muestra se corresponde a solo cinco parejas de la línea germinal. Por lo tanto, se puede combinar un pequeño número de los genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera expresados de forma destacada (no apareados) para generar un grupo de parejas que son representativas del repertorio inmune humano.

Por lo tanto, unos aspectos de la presente descripción comprenden colecciones de anticuerpos o de fragmentos de los mismos que comprenden parejas de proteínas representativas de la línea germinal, que reproducen con precisión o incluyen la mayoría de las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable expresadas de forma destacada, del repertorio inmune humano o del repertorio inmune humano no activado. Como se describe más adelante, nuestra metodología conduce a colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos que se pueden desarrollar totalmente, ya que las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable se someten primero a ensayo para estudiar propiedades biofísicas favorables y luego se diseñan colecciones para incluir las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden una o varias de estas propiedades biofísicas favorables.

Unos aspectos de la presente descripción comprenden métodos para producir una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden la etapa de identificar las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab pmx11_FH VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunos aspectos, la presente descripción comprende métodos para producir una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprende generar una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y la variable ligera variable, en donde dicha una o varias regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende una o varias de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C. En algunas realizaciones las regiones FR1, FR2 y FR3 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal.

En algunas realizaciones, las regiones FR1, FR2 y FR3 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones CDR1 y CDR2 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones CDR1 y CDR2 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, la región FR4 comprende la región JH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, la región FR4 comprende la región Jk1 de la cadena ligera. En algunas realizaciones, la región FR4 comprende la región JA2/3 de la cadena ligera.

En otras realizaciones la presente descripción se refiere a métodos para producir colecciones de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden generar una colección, en donde generar comprende además las etapas de sintetizar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos; clonar los ácidos nucleicos en un vector; y expresar los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.

Una vez que el grupo expresado de forma destacada o un grupo representativo del mismo de parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable se sintetizó y se sometió a ensayo,

a continuación, se pudieron diseñar colecciones para incluir parejas de proteínas de la línea germinal que comprendían propiedades biofísicas favorables.

Unos aspectos de la presente descripción comprenden colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos obtenidas a partir de las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, se obtienen a partir de las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen tales propiedades.

Unos aspectos de la presente descripción comprenden colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprenden sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen tales propiedades.

Unos aspectos de la presente descripción comprenden colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden una o varias de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C, en donde en algunas realizaciones, una o varias de las regiones estructurales y/o de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen tales propiedades.

En algunos aspectos de la descripción, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprende una o varias de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones, las regiones estructurales que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal comprenden regiones FR1, FR2 y FR3. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones CDR1 y CDR2 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones CDR1 y CDR2 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, la región FR4 comprende la región JH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, la región FR4 comprende la región Jk1 de la cadena ligera. En algunas realizaciones, la región FR4 comprende la región Jλ2/3 de la cadena ligera.

En algunas realizaciones, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regio-

nes estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprende al menos dos de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_V11-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a colecciones de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprende al menos tres de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_V11-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a colecciones de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprende al menos cuatro de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_V11-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a colecciones de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprende al menos cinco de las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_V11-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, que comprende las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_V11-40 AYA cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C, en donde dicha colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de al menos dos parejas de proteínas diferentes de la línea germinal, y en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal está codificada por una pareja de genes de la línea germinal, en donde las parejas de proteínas de la línea germinal se seleccionan a partir de IGHV1-18/IGKV1-05; IGHV1-18 /IGLV2-23; IGHV1-46/IGKV1-09; IGHV1-46/IGKV1-39; IGHV1-46/IGKV3-15; IGHV1-69*01/IGKV1-05; IGHV3-07/IGKV1-09; IGHV3-07/IGKV1-12; IGHV3-07/IGKV1-27; IGHV3-07/IGKV3-15; IGHV3-07 /IGLV1-47; IGHV3-07 /IGLV2-23; IGHV3-07 /IGLV3-01; IGHV3-11/IGKV1-05; IGHV3-11/IGKV1-06; IGHV3-11/IGKV1-12; IGHV3-11 /IGKV1-16; IGHV3-11/IGKV3-15; IGHV3-11/IGLV1-47; IGHV3-11/IGLV2-23; IGHV3-15/IGKV1-05; IGHV3-15/IGKV1-06; IGHV3-15/IGKV1-09; IGHV3-15/IGKV1-12; IGHV3-15/IGKV1-16; IGHV3-15/IGKV1-27; IGHV3-15/IGKV1-39; IGHV3-15/IGKV3-15; IGHV3-15/IGLV1-40; IGHV3-15/IGLV1-51; IGHV3-15/IGLV2-11; IGHV3-21/IGKV1-06; IGHV3-21/IGKV1-12; IGHV3-21/IGKV1-27; IGHV3-21/IGKV1-39; IGHV3-21/IGLV2-14; IGHV3-21/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV3-1; IGHV3-33/IGKV3-15; IGHV3-33/IGLV2-23; IGHV3-48/IGKV1-27; IGHV3-53/IGKV1-09; IGHV3-53/IGKV1-12; IGHV3-53/IGLV1-51; IGHV3-53/IGLV2-23; IGHV3-53/IGLV3-1; IGHV3-74/IGKV1-06; IGHV3-74/IGKV1-09; IGHV3-74/IGKV1-27; IGHV3-74/IGKV3-15; IGHV3-74/IGLV1-51; IGHV4-04/IGLV2-23; IGHV4-04/IGLV3-1; IGHV4-04/IGLV3-21; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-1; IGHV5-51/IGKV1-09; IGHV5-51/IGLV2-23; IGHV5-51/IGLV3-1; IGHV6-1/IGKV1-06; y IGHV6-1/IGLV2-23, cuyas secuencias se describen en las Figuras 45 A-C, las Figuras 46 A-C y las Figuras 47 A-B.

En algunas realizaciones de la presente descripción, las colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos fun-

ten en secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprende las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades: i) estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; y ii) estabilidad en suero en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades: i) estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; ii) estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; iii) estabilidad en suero en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iii) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; y iv) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades: i) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; ii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iii) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; iv) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y v) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En otros aspectos, las colecciones de la presente descripción comprenden una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades: i) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; ii) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; iii) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y iv) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En otras realizaciones de la presente descripción, las colecciones de la presente invención y/o los métodos para producir tales colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprenden una tasa de presentación relativa en formato Fab de al menos 0,1 en comparación con un testigo; de al menos 0,2 en comparación con un testigo; de al menos 0,3 en comparación con el testigo; de al menos 0,4 en comparación con el testigo; de al menos 0,5 en comparación con el testigo; de al menos 0,6 en comparación con el testigo; de al menos 0,7 en comparación con el testigo; de al menos 0,8 en comparación con el testigo; de al menos 0,9 en comparación con el testigo; de al menos 1,0 en comparación con el testigo; de al menos 1,1 en comparación con el testigo; de al menos 1,2 en comparación con el testigo; de al menos 1,3 en comparación con el testigo; de al menos 1,4 en comparación con el testigo; de al menos 1,5 en comparación con el testigo; de al menos 1,6 en comparación con el testigo; de al menos 1,7 en comparación con el testigo; de al menos 1,8 en comparación con el testigo; de al menos 1,9 en comparación con el testigo; de al menos 2,0 en comparación con el testigo; de al menos 2,1 en

comparación con el testigo; de al menos 2,2 en comparación con el testigo; de al menos 2,3 en comparación con el testigo; de al menos 2,4 en comparación con el testigo; de al menos 2,5 en comparación con el testigo; de al menos 2,6 en comparación con el testigo; de al menos 2,7 en comparación con el testigo; de al menos 2,8 en comparación con el testigo; de al menos 2,9 en comparación con el testigo; de al menos 3,0 en comparación con el testigo; de al menos 3,2 en comparación con el testigo; de al menos 3,3 en comparación con el testigo; de al menos 3,4 en comparación con el testigo; de al menos 3,5 en comparación con el testigo; de al menos 3,6 en comparación con el testigo; de al menos 3,7 en comparación con el testigo; de al menos 3,8 en comparación con el testigo; de al menos 4,1 en comparación con el testigo; de al menos 4,3 en comparación con el testigo; de al menos 4,4 en comparación con el testigo; de al menos 4,5 en comparación con el testigo; de al menos 4,6 en comparación con el testigo; de al menos 4,7 en comparación con el testigo; de al menos 5,0 en comparación con el testigo; de al menos 5,1 en comparación con el testigo; de al menos 5,2 en comparación con el testigo; de al menos 5,4 en comparación con el testigo; de al menos 5,5 en comparación con el testigo; de al menos 5,7 en comparación con el testigo; de al menos 5,9 en comparación con el testigo; de al menos 6,0 en comparación con el testigo; de al menos 6,1 en comparación con el testigo; de al menos 6,3 en comparación con el testigo; de al menos 6,4 en comparación con el testigo; de al menos 6,7 en comparación con el testigo; de al menos 6,9 en comparación con el testigo; de al menos 7,0 en comparación con el testigo; de al menos 7,1 en comparación con el testigo; de al menos 7,2 en comparación con el testigo; de al menos 7,3 en comparación con el testigo; de al menos 7,4 en comparación con el testigo; de al menos 8,1 en comparación con el testigo; de al menos 8,2 en comparación con el testigo; de al menos 8,3 en comparación con el testigo; de al menos 8,4 en comparación con el testigo; de al menos 8,5 en comparación con el testigo; de al menos 8,6 en comparación con el testigo; de al menos 8,7 en comparación con el testigo; de al menos 8,8 en comparación con el testigo; de al menos 8,9 en comparación con el testigo; de al menos 9,1 en comparación con el testigo; de al menos 9,2 en comparación con el testigo; de al menos 9,3 en comparación con el testigo; de al menos 9,4 en comparación con el testigo; de al menos 9,5 en comparación con el testigo; de al menos 9,7 en comparación con el testigo; de al menos 9,8 en comparación con el testigo; de al menos 10,0 en comparación con el testigo; de al menos 10,2 en comparación con el testigo; de al menos 10,3 en comparación con el testigo; de al menos 10,5 en comparación con el testigo; de al menos 10,6 en comparación con el testigo; de al menos 10,7 en comparación con el testigo; de al menos 10,8 en comparación con el testigo; de al menos 11,0 en comparación con el testigo; de al menos 11,2 en comparación con el testigo; de al menos 11,3 en comparación con el testigo; de al menos 11,5 en comparación con el testigo; de al menos 11,7 en comparación con el testigo; de al menos 11,8 en comparación con el testigo; de al menos 12,1 en comparación con el testigo; de al menos 12,3 en comparación con el testigo; de al menos 12,4 en comparación con el testigo; de al menos 12,9 en comparación con el testigo; de al menos 13,0 en comparación con el testigo; de al menos 13,6 en comparación con el testigo; de al menos 14,4 en comparación con el testigo; de al menos 14,5 en comparación con el testigo; de al menos 16,1 en comparación con el testigo; de al menos 16,6 en comparación con el testigo; de al menos 16,7 en comparación con el testigo; de al menos 17,1 en comparación con el testigo; de al menos 19,4 en comparación con el testigo; de al menos 27,3 en comparación con el testigo; o de al menos 29,0 en comparación con el testigo.

En algunas realizaciones, la colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 10% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 15% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 20% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 25% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 30% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 35% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 40% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 45% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 50% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 55% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro de la parte superior del 60% de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 65% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 70% superior de los Fabs sometidos a ensayo; un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo.

En otras realizaciones, las colecciones de la presente invención y/o los métodos para producir tales colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprende un nivel de expresión relativa en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; de al menos 0,5 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; de al menos 0,6 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; de al menos 0,7 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; de al menos 0,8 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; de al menos 0,9 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; de al menos 1,0 en comparación con VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; de al menos 1,1 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; de al menos 1,2 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; o de al menos 1,3 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A.

En otras realizaciones de la presente descripción, las colecciones de la presente invención y/o los métodos para producir tales colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regio-

nes estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que tiene estabilidad térmica a 70°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; o que tiene estabilidad térmica a 80°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab.

5 En otras realizaciones, las colecciones de la presente invención y/o los métodos para producir tales colecciones comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal que comprende un nivel de expresión relativa en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; de al menos 0,5 en comparación con MOR03080; de al menos 0,6 en comparación con MOR03080; de al menos 0,7 en comparación con MOR03080; de al menos 0,8 en comparación con MOR03080; de al menos 0,9 en comparación con MOR03080; de al menos 1,0 en comparación con MOR03080; de al menos 1,1 en comparación con MOR03080; de al menos 1,2 en comparación con MOR03080; de al menos 1,3 en comparación con MOR03080; de al menos 1,4 en comparación con MOR03080 de al menos 1,5 en comparación con MOR03080; de al menos 1,6 en comparación con MOR03080; de al menos 1,7 en comparación con MOR03080; de al menos 1,8 en comparación con MOR03080; de al menos 1,9 en comparación con MOR03080, cuyas secuencias de CDRs se describen en la Tabla 31.

20 En ciertos aspectos, la presente descripción comprende colecciones y métodos para producir o emplear las colecciones de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, sustancialmente secuencias de la línea germinal o secuencias obtenidas a partir de las secuencias de proteínas de la línea germinal. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una CDR1 y una CDR2 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una CDR1 y una CDR2 que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de la pareja de proteínas de la línea germinal.

25 En algunos aspectos, una o varias regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la pareja de proteínas de la línea germinal. Como en algunos aspectos, FR4 se selecciona a partir del grupo que consiste en JH4, Jk1 y JλA2/3. Como se muestra en las Figuras 45A-47B las secuencias de proteínas de la línea germinal comprenden solo FR1-FR3. Por lo tanto, en ciertos aspectos, cuando dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, FR1, FR2 y/o FR3 comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunos aspectos, una o varias regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, lo que permite la diversificación de una o varias regiones determinantes de complementariedad. En algunas realizaciones, la presente invención comprende colecciones y métodos para producir y preparar dichas colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden una región HCDR3 diversificada. En algunas realizaciones, la presente invención comprende colecciones y métodos de producción para producir y utilizar dichas colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden una región LCDR3 diversificada.

40 Un aspecto adicional de la presente invención es la capacidad de las colecciones para ser útiles en la identificación de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno. Se pensaba que la generación de colecciones con al menos dos parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden las propiedades funcionales anteriores, proporcionaría una diversidad dentro de la colección, sobre todo dentro de las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos de la colección, en términos de longitud de CDR y diversidad en conformaciones o estructuras canónicas. Esto permite que las colecciones de la presente invención sean útiles en la identificación de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno.

45 Algunas realizaciones de la descripción comprenden colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde las regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de genes de la línea germinal, que comprenden las siguientes propiedades: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C, en donde dicha colección comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden al menos dos parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos tres parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos cuatro parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos cinco parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos seis parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos siete parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos ocho parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos nueve parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos diez parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos once parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos doce parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos trece parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos catorce

parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos quince parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos dieciséis parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos diecisiete parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos dieciocho parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos diecinueve parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos veinte parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 21 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 22 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 23 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 24 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 25 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 26 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 27 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 28 proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 29 secuencias de parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 30 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 31 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 32 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 33 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 34 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 35 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 36 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 37 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 38 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 39 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 40 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 41 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 42 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 43 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 44 proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable; al menos 45 secuencias de parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 46 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 47 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 48 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal; al menos 49 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal o al menos 50 parejas de proteínas diferentes de la línea germinal.

Anticuerpos o fragmentos funcionales los mismos que comprenden secuencias de genes de la línea germinal

Adicionalmente, se pensó que la utilización de secuencias de proteínas de la línea germinal debería reducir el riesgo de inmunogenicidad de los anticuerpos cuando se administraban a pacientes. Por lo tanto, aspectos de la presente invención comprenden colecciones y métodos para producir y emplear dichas colecciones de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprenden sustancialmente secuencias de la línea germinal. En algunas realizaciones, las regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable de los anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos se obtienen a partir de secuencias de la línea germinal. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden regiones FR1, FR2, FR3 y FR4 que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal, sustancialmente secuencias de la línea germinal o se obtienen a partir de las secuencias de proteínas de la línea germinal. En determinadas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden FR1, FR2, FR3 que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de la pareja de proteínas de la línea germinal representativa. En algunas realizaciones, la región FR4 que se utiliza es JH4 para la cadena pesada variable, JK1 para la cadena ligera κ variable y J λ 2/3 para la cadena ligera λ variable.

De nuevo, como la utilización de secuencias de proteínas de la línea germinal debería reducir el riesgo de inmunogenicidad de los anticuerpos cuando se administran a pacientes, ciertos aspectos de la presente invención comprenden colecciones y métodos para producir o emplear las colecciones de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, sustancialmente secuencias de la línea germinal o se obtienen a partir de las secuencias de proteínas de la línea germinal. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una CDR1 y una CDR2 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una CDR1 y una CDR2 que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de la pareja de proteínas de la línea germinal.

En algunos aspectos, una o varias regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, lo que permite la diversificación de una o varias regiones determinantes de complementariedad. En algunas realizaciones, la presente invención comprende colecciones y métodos para producir y preparar dichas colecciones de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden una región HCDR3 diversificada. En algunas realizaciones, la presente invención comprende colecciones y métodos para producir y emplear dichas colecciones de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos, que comprenden una región LCDR3 diversificada. Las CDRs se pueden diseñar por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en Knappik et al. 2000; documentos WO 97/08320; WO2008053275; WO2009036379 WO2007056441; WO200914815.

Además, con el fin de generar colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que tienen un bajo riesgo de inmunogenicidad, en ciertos aspectos, la colección de la presente invención y los métodos de producción y uso de la misma, comprenden anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que com-

prenden secuencias humanas.

En algunos aspectos, la colección de la invención comprende al menos 1×10^4 al menos 1×10^5 al menos 1×10^6 al menos 1×10^7 al menos 1×10^8 al menos 1×10^9 al menos 1×10^{10} o al menos 1×10^{11} secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.

5

En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos de las colecciones son sintéticos.

En algunos aspectos, las colecciones comprenden ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.

Realizaciones adicionales de la presente invención

10 En algunos aspectos, la presente invención comprende una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal,

15 en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades:

- i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA, cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080 cuyas secuencias de CDR se describen en la Tabla 31; y
- vi) una estabilidad en suero en formato IgG durante catorce días a 37°C;

25 en donde dicha colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de al menos dos parejas de proteínas diferentes de la línea germinal, y

en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal está codificada por una pareja de genes de la línea germinal, en donde las parejas de proteínas de la línea germinal se seleccionan a partir de IGHV1-18/IGKV1-05; IGHV1-18 /IGLV2-23; IGHV1-46/IGKV1-09; IGHV1-46/IGKV1-39; IGHV1-46 /IGKV3-15; IGHV1-69*01/IGKV1-05; IGHV3-07/IGKV1-09; IGHV3-07/IGKV1-12; IGHV3-07/IGKV1-27; IGHV3-07/IGKV3-15; IGHV3-07 /IGLV1-47; IGHV3-07/IGLV2-23; IGHV3-07/IGLV3-01; IGHV3-11/IGKV1-05; IGHV3-11/IGKV1-06; IGHV3-11/IGKV1-12; IGHV3-11 /IGKV1-16; IGHV3-11/IGKV3-15; IGHV3-11/IGLV1-47; IGHV3-11/IGLV2-23; IGHV3-15/IGKV1-05; IGHV3-15/IGKV1-06; IGHV3-15/IGKV1-09; IGHV3-15/IGKV1-12; IGHV3-15/IGKV1-16; IGHV3-15/IGKV1-27; IGHV3-15/IGKV1-39; IGHV3-15/IGKV3-15; IGHV3-15/IGLV1-40; IGHV3-15/IGLV1-51; IGHV3-15/IGLV2-11; IGHV3-15/IGLV2-14; IGHV3-21/IGKV1-06; IGHV3-21/IGKV1-12; IGHV3-21/IGKV1-27; IGHV3-21/IGKV1-39; IGHV3-21/IGLV2-14; IGHV3-21/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV3-1; IGHV3-33/IGKV3-15; IGHV3-33/IGLV2-23; IGHV3-48/IGKV1-27; IGHV3-53/IGKV1-09; IGHV3-53/IGKV1-12; IGHV3-53/IGLV1-51; IGHV3-53/IGLV2-23; IGHV3-53/IGLV3-1; IGHV3-74/IGKV1-06; IGHV3-74/IGKV1-09; IGHV3-74/IGKV1-27; IGHV3-74/IGKV3-15; IGHV3-74/IGLV1-51; IGHV4-04/IGLV2-23; IGHV4-04/IGLV3-1; IGHV4-04/IGLV3-21; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-1; IGHV5-51/IGKV1-09; IGHV5-51/IGLV2-23; IGHV5-51/IGLV3-1; IGHV6-1/IGKV1-06; y IGHV6-1/IGLV2-23, cuyas secuencias se describen en las Figuras 45 A-C, las Figuras 46 A-C y las Figuras 47 A-B.

30

35

40

45

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

- i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;

50

- v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y
- vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones, la presente descripción comprende una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal, que comprenden las siguientes propiedades:

- i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y
- vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,05% en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,23% en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,51% en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,07% en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,52% en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,88% en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden secuencias humanas. En algunas realizaciones, dicha colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de al menos diecisiete parejas de proteínas diferentes de la línea germinal.

En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región FR4 seleccionada a partir del grupo que consiste en: JH4, Jk1 y JλA2/3. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región HCDR3 diversificada. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región LCDR3 diversificada.

En algunas realizaciones, la colección comprende 1×10^4 anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos. En algunas realizaciones, dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 60% superior de los Fabs sometidos a ensayo. En algunas realizaciones, dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,6 en comparación con Fab VH1-69 VLA VI1-40 AYA. En algunas realizaciones, dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden una estabilidad térmica a 70°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab. En algunas realizaciones, dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,6 en comparación con MOR03080.

En algunas realizaciones, las regiones estructurales de la cadena pesada variable y ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal seleccionadas a partir del grupo que consiste en: IGHV3-23/IGKV1-5; IGHV3-23/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV3-15; IGHV3-23/IGKV3-15; IGHV4-39/IGKV1-39/1D-39; IGHV1-18/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV1-5; IGHV1-69/IGKV1-39/1D-39; IGHV5-51/IGLV 1-40; IGHV4-39/IGKV3-20; IGHV3-23/IGLV 2-14; IGHV4-39/IGLV 3-21; IGHV3-23/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-30/IGKV1-39/1D-39; IGHV1-69/IGKV3-20; IGHV3-48/IGKV3-20; IGHV1-2/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV4-1; IGHV5-51/IGLV 2-14; IGHV5-51/IGKV3-20; IGHV3-7/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-7/IGKV1-5; IGHV3-15/IGKV3-20; IGHV4-39/IGLV 2-14; IGHV3-23/IGKV3-11; IGHV3-30/IGKV1-5; IGHV3-30/IGKV3-15; IGHV3-21/IGKV1-5; IGHV3-21/IGKV3-15; IGHV3-30/IGLV 1-51; IGHV3-21/IGLV 1-51; y IGHV1-69/IGKV3-11.

En algunas realizaciones, dichos fragmentos funcionales de dichos anticuerpos se seleccionan a partir del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab', Fv y scFv.

En algunos aspectos, la presente invención comprende una colección de ácidos nucleicos que codifican colecciones de anticuerpos sintéticos de la presente invención. En algunos aspectos, la presente invención comprende un vector

que comprende los ácidos nucleicos que codifican colecciones de anticuerpos sintéticos de la presente invención. En algunos aspectos, la presente invención comprende una célula hospedadora recombinante que comprende los ácidos nucleicos que codifican las colecciones de anticuerpos sintéticos de la presente invención. En algunas realizaciones, la célula hospedadora recombinante es procarionota o eucariota. En algunas realizaciones, la célula hospedadora recombinante es *E. coli* o de mamífero.

En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable,

en donde dichas regiones estructurales comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal,

en donde dichas secuencias de proteínas de la línea germinal comprenden las siguientes propiedades:

- i) cuatro modificaciones postraduccionales o menos en las regiones determinantes de complementariedad;
- ii) dos metioninas o menos en las regiones determinantes de complementariedad;
- iii) una cisteína o menos no apareada;
- iv) un epítipo potencial de linfocitos T o menos;
- v) una propensión intermedia o baja a la agregación; y
- vi) un punto isoeléctrico de al menos 7,5; y

en donde dicha colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprende al menos dos secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable,

en donde dicha secuencia de proteínas de la línea germinal está codificada por una secuencia de genes de la línea germinal.

En algunas realizaciones, dichas secuencias de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o de la cadena ligera variable están presentes en una concentración de al menos 0,5% en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, dicha colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprende al menos cinco secuencias de proteínas diferentes de la línea germinal de la cadena pesada variable. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden secuencias humanas. En algunas realizaciones, dichas secuencias de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable o de la cadena ligera variable están presentes en una concentración de al menos 5,0% en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región FR4 seleccionada entre el grupo que consiste en: JH4, Jk1 y Jλ2/3. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden además una región HCDR3 diversificada. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden además una región LCDR3 diversificada. En algunas realizaciones, la colección comprende 1×10^4 anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.

En algunas realizaciones, dichas secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable se seleccionan a partir del grupo que consiste en: IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV4-39; IGHV4-34; IGHV4-59; IGHV1-69; IGHV5-51; IGHV3-7; IGHV1-18; IGHV3-48; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV1-2; IGHV3-33; IGHV4-31; IGHV3-53; IGHV3-11; IGHV3-9; IGHV4-4; IGHV1-46; IGHV3-74; IGHV1-24; IGHV4-61; IGHV1-8; IGHV1-3; IGHV3-49; IGHV3-43; IGHV4-28; IGHV3-64; y IGHV7-81.

En algunas realizaciones, las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena ligera κ variable se seleccionan a partir del grupo que consiste en: IGKV3-20; IGKV1-39/1D-39; IGKV1-5; IGKV3-15; IGKV4-1; IGKV3-11; IGKV2-28/2D-28; IGKV1-33/1D-33; IGKV2-30; IGKV1-9; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-8; IGKV1-16; IGKV1-6; IGKV1-12; IGKV2D-29; IGKV1-13; IGKV1D-8; y IGKV2-24.

En algunas realizaciones, las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena ligera λ variable se seleccionan a partir del grupo que consiste en: IGLV2-14; IGLV1-40; IGLV1-44; IGLV1-51; IGLV2-23; IGLV3-21; IGLV1-47; IGLV3-1; IGLV2-11; IGLV2-8; IGLV6-57; IGLV3-25; IGLV7-46; IGLV1-36; IGLV7-43; IGLV9-49; IGLV4-69; IGLV2-18; IGLV3-10; y IGLV3-27.

En algunos aspectos, la presente invención comprende un método para producir las colecciones de anticuerpos sintéticos de la presente invención. En algunas realizaciones, las etapas de producción comprenden además generar una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable, en donde dichas regiones estructurales de la cadena

pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal,

en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades:

- 5 i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA, cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- 10 v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080 cuyas secuencias de CDR se describen en la Tabla 31; y
- vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C; y

en donde dicha colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprende al menos dos parejas de proteínas diferentes de la línea germinal y en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal está codificada por una pareja de genes de la línea germinal,

- 15 en donde las parejas de proteínas de la línea germinal se seleccionan a partir de IGHV1-18/IGKV1-05; IGHV1-18/IGLV2-23; IGHV1-46/IGKV1-09; IGHV1-46/IGKV1-39; IGHV1-46 /IGKV3-15; IGHV1-69*01/IGKV1-05; IGHV3-07/IGKV1-09; IGHV3-07/IGKV1-12; IGHV3-07/IGKV1-27; IGHV3-07/IGKV3-15; IGHV3-07 /IGLV1-47; IGHV3-07/IGLV2-23; IGHV3-07 /IGLV3-01; IGHV3-11/IGKV1-05; IGHV3-11/IGKV1-06; IGHV3-11/IGKV1-12; IGHV3-11/IGKV1-16; IGHV3-11/IGKV3-15; IGHV3-11/IGLV1-47; IGHV3-11/IGLV2-23; IGHV3-15/IGKV1-05; IGHV3-15/IGKV1-06; IGHV3-15/IGKV1-09; IGHV3-15/IGKV1-12; IGHV3-15/IGKV1-16; IGHV3-15/IGKV1-27; IGHV3-15/IGKV1-39; IGHV3-15/IGKV3-15; IGHV3-15/IGLV1-40; IGHV3-15/IGLV1-51; IGHV3-15/IGLV2-11; IGHV3-21/IGKV1-06; IGHV3-21/IGKV1-12; IGHV3-21/IGKV1-27; IGHV3-21/IGKV1-39; IGHV3-21/IGLV2-14; IGHV3-21/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV3-1; IGHV3-33/IGKV3-15; IGHV3-33/IGLV2-23; IGHV3-48/IGKV1-27; IGHV3-53/IGKV1-09; IGHV3-53/IGKV1-12; IGHV3-53/IGLV1-51; IGHV3-53/IGLV2-23; IGHV3-53/IGLV3-1; IGHV3-74/IGKV1-06; IGHV3-74/IGKV1-09; IGHV3-74/IGKV1-27; IGHV3-74/IGKV3-15; IGHV3-74/IGLV1-51; IGHV4-04/IGLV2-23; IGHV4-04/IGLV3-1; IGHV4-04/IGLV3-21; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-1; IGHV5-51/IGKV1-09; IGHV5-51/IGLV2-23; IGHV5-51/IGLV3-1; IGHV6-1/IGKV1-06; y IGHV6-1/IGLV2-23, cuyas secuencias se describen en las Figuras 45 A-C, las Figuras 46 A-C y las Figuras 47 A-B.

30 En algunas realizaciones, la etapa de producción comprende además las etapas de

- a) obtener datos que comprenden las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano;
- b) identificar las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que comprenden las siguientes propiedades:

- 35 i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab pMx11_FH VH1-69 VLA_VI1-40 AYA;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- 40 iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y
- vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C; y

c) generar una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprende las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable identificadas en la etapa b).

45

En algunas realizaciones, la etapa b) comprende adicionalmente las etapas de

- ba) identificar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en una concentración de al menos 0,05% en el repertorio inmune humano;

bb) generar anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden las parejas de proteínas de la línea germinal identificadas en la etapa ba); y

bc) evaluar las siguientes propiedades de dichas parejas de proteínas de la línea germinal:

- i) una tasa de presentación relativa en formato Fab;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- v) un nivel de expresión en formato IgG; y
- vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

En algunas realizaciones, la etapa a) comprende además las siguientes etapas:

- aa) aislar linfocitos B humanos a partir de una muestra;
- ab) generar ADNc a partir de los linfocitos B;
- ac) amplificar con PCR los ADNc procedentes de los linfocitos B;
- ad) secuenciar los productos de la PCR;

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

En algunas realizaciones, la etapa de generar una colección comprende además las etapas siguientes: ca) sintetizar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos; cb) clonar los ácidos nucleicos en un vector;

cc) expresar los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.

En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,05% en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,23% en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,51% en el repertorio inmune humano. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,07% en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,52% en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes en una concentración de al menos 0,88% en el repertorio inmune humano no activado. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden secuencias humanas. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de al menos diecisiete parejas de proteínas diferentes de la línea germinal. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal.

En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región FR4 seleccionada a partir del grupo que consiste en: JH4, Jk1 y Jλ2/3. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región HCDR3 diversificada. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región LCDR3 diversificada. En algunas realizaciones, la colección comprende 1 X 10⁴ anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.

En algunas realizaciones, dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden una presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 60% superior de los Fabs sometidos a ensayo. En algunas realizaciones, dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,6 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA. En algunas realizaciones, dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden una estabilidad térmica a 70°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab. En algunas realizaciones, dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,6 en comparación con MOR03080.

En algunas realizaciones de la descripción, las regiones estructurales de la cadena pesada y la ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal seleccionada a partir del grupo que consiste en: IGHV3-23/IGKV1-5; IGHV3-23/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV3-15; IGHV3-23/IGKV3-

15; IGHV4-59/IGKV1-39/1 D-39; IGHV4-39/IGKV1-39/1 D-39; IGHV4-59/IGKV3-20; IGHV1-18/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV1-5; IGHV1-69/IGKV1-39/1 D-39; IGHV5-51/IGLV 1-40; IGHV3-23/IGKV4-1; IGHV4-39/IGKV3-20; IGHV3-23/IGLV 2-14; IGHV4-39/IGLV 3-21; IGHV3-23/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-30/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-30/IGKV3-11; IGHV1-69/IGKV3-20; IGHV3-48/IGKV3-20; IGHV1-2/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV4-1; IGHV5-51/IGLV 2-14; IGHV4-59/IGKV4-1; IGHV5-51/IGKV3-20; IGHV3-7/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-7/IGKV1-5; IGHV3-15/IGKV3-20; IGHV4-39/IGLV 2-14; IGHV4-39/IGLV 2-8; IGHV3-23/IGKV3-11; IGHV3-30/IGKV1-5; IGHV3-30/IGKV3-15; IGHV3-21 /IGKV1-5; IGHV3-21/IGKV3-15; IGHV3-30/IGLV 1-51; IGHV3-21/IGLV 1-51; IGHV3-53/IGLV 1-44; IGHV4-59/IGKV3-15; IGHV5-51/IGKV4-1; IGHV1-69/IGKV4-1; y IGHV1-69/IGKV3-11.

En algunos aspectos, dichos fragmentos funcionales de dichos anticuerpos se seleccionan a partir del grupo que consiste en Fab, F(ab)², Fab', Fv y scFv.

También se describe en esta memoria un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia señal o líder que comprende un sitio de restricción C-terminal. En algunas realizaciones, el sitio de restricción es NheI. En algunas realizaciones, la secuencia señal o líder comprende phoA o una secuencia líder de la cadena pesada humana. En algunas realizaciones, el sitio de restricción es NdeI. En algunas realizaciones, la secuencia señal comprende ompA o una secuencia líder de kappa humana.

También se describe en esta memoria un vector que comprende los ácidos nucleicos que codifican la secuencia señal o líder que comprende un sitio de restricción C-terminal. En algunos aspectos, la presente invención comprende una célula hospedadora que comprende el vector. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es procarionota o eucariota. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es *E. coli*. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es de mamífero.

En algunos aspectos, la presente descripción comprende un anticuerpo aislado o un fragmento funcional del mismo, que comprende una FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 y que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal, en donde la pareja de proteínas de la línea germinal se selecciona a partir del grupo que consiste en: IGHV3-23/IGKV1-5; IGHV3-23/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV3-15; IGHV3-23/IGKV3-15; IGHV4-39/IGKV1-39/1D-39; IGHV1-18/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV1-5; IGHV1-69/IGKV1-39/1D-39; IGHV5-51/IGLV 1-40; IGHV4-39/IGKV3-20; IGHV3-23/IGLV 2-14; IGHV4-39/IGLV 3-21; IGHV3-23/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-30/IGKV1-39/1D-39; IGHV1-69/IGKV3-20; IGHV3-48/IGKV3-20; IGHV1-2/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV4-1; IGHV5-51/IGLV 2-14; IGHV5-51/IGKV3-20; IGHV3-7/IGKV1-39/1 D-39; IGHV3-7/IGKV1-5; IGHV3-15/IGKV3-20; IGHV4-39/IGLV 2-14; IGHV3-23/IGKV3-11; IGHV3-30/IGKV1-5; IGHV3-30/IGKV3-15; IGHV3-21/IGKV1-5; IGHV3-21/IGKV3-15; IGHV3-30/IGLV 1-51; IGHV3-21/IGLV 1-51; y IGHV1-69/I.

En un aspecto, la presente descripción describe colecciones de anticuerpos que comprenden regiones estructurales de la cadena pesada y la cadena ligera variable que comprenden secuencias de la línea germinal, específicamente FR1. Se espera que teniendo regiones estructurales de la línea germinal se reduzca el riesgo de inmunogenicidad de los anticuerpos cuando se administran a pacientes. Sin embargo, los sitios de restricción se deben utilizar con el fin de permitir una clonación convencional de los ácidos nucleicos que codifican las colecciones de anticuerpos, en vectores de presentación y/o expresión de modo que los anticuerpos se puedan escrutar en busca de inmunógenos. En el pasado, los sitios de restricción utilizados para la clonación se encontraban frecuentemente dentro de las regiones estructurales, modificando de este modo la secuencia de ácido nucleico, alejándola de la línea germinal. Con el fin de garantizar que al menos la región estructural 1 (FR1) de cada uno de los anticuerpos de la presente descripción conserva una secuencia de la línea germinal, no debería haber ningún sitio de restricción de origen no natural dentro de FR1. Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción es la incorporación de un sitio de restricción en el extremo C-terminal de secuencias señal procarióticas y una secuencia líder humana, específicamente dentro de los tres residuos C-terminales. Adicionalmente, la secuencia señal y la secuencia líder que comprenden un sitio de restricción deben ser funcionales y permitir buenos niveles de presentación y de expresión de los anticuerpos o de fragmentos de los mismos en ambos sistemas de expresión procariotas y de mamíferos.

En algunos aspectos, la presente descripción comprende un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia señal o líder que comprende un sitio de restricción C-terminal. En algunos aspectos, el sitio de restricción es NheI o NdeI. En algunas realizaciones la secuencia señal o líder comprende phoA o una secuencia líder de la cadena pesada humana. En algunas realizaciones la secuencia señal o líder comprende ompA o una secuencia líder de kappa humana. En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico aislado que codifica una secuencia señal o líder que comprende un sitio de restricción C-terminal. En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico aislado que codifica una secuencia señal o líder que comprende un sitio de restricción C-terminal o el vector que comprende el ácido nucleico aislado que codifica una secuencia señal o líder que comprende un sitio de restricción C-terminal. En algunas realizaciones, la célula hospedadora en cuestión es procarionota, por ejemplo *E. coli*, o eucariota, por ejemplo, de mamífero.

La presente descripción es la primera en describir el concepto de que las parejas de clase VH y VL que son más prevalentes en un repertorio inmune humano no activado, tienen probablemente características preferidas, tales como, una mayor estabilidad y menor inmunogenicidad. La presente descripción también es la primera en incorporar este concepto en el diseño de una colección y en utilizar una síntesis de genes total para generar este tipo de colec-

- ciones. La presente descripción permite métodos de identificación de las parejas de clase VH y VL en los repertorios inmunes humanos no activados y con experiencia con antígenos, de determinación de las parejas de clase VH y VL que son más prevalentes y después de generación de colecciones que comprenden las parejas de clase VH y VL. Más concretamente, las colecciones de la presente descripción comprenden los emparejamientos de clase VH y VL más prevalentes y/o preferidos con CDRs altamente diversificadas. Esta estrategia aumenta la probabilidad de que las colecciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos contra cualquier inmunógeno que son estables, tengan una inmunogenicidad reducida y alta afinidad hacia el antígeno específico. El resultado es un aumento considerable de la probabilidad de que las colecciones comprendan anticuerpos o fragmentos de los mismos muy eficaces contra cualquier inmunógeno, que se pueden utilizar con fines terapéuticos o de diagnóstico.
- 5 Por consiguiente, las secuencias de ácidos nucleicos (o una porción seleccionada de los mismos) que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos obtenidos a partir de los linfocitos B no activados procedentes de hospedadores humanos, se pueden secuenciar. A partir de estos datos de secuencias, se pueden identificar emparejamientos de clases de cadenas de la familia VH/VL de la línea germinal, representados en el repertorio inmune. Basándose en ciertos criterios, tales como la prevalencia y/o propiedades biofísicas favorables, se seleccionan las parejas de clase de cadena pesada y ligera para la incorporación en colecciones. Las colecciones se pueden sintetizar a continuación mediante síntesis génica. En algunas realizaciones, las colecciones sintéticas comprenden sustancialmente regiones estructurales VH y VL de la línea germinal, en donde las CDRs están diversificadas, o solo una CDR de una VH y/o VL está diversificada.
- 10 Con el empleo de las secuencias de ADN obtenidas a partir de linfocitos B no activados, procedentes de hospedadores humanos, como un "molde", la presente descripción permite métodos para identificar las parejas de VH y VL de mayor prevalencia. Una vez que se ha esclarecido la abundancia relativa de los emparejamientos de clase VH y VL, se puede generar una colección de anticuerpos o fragmentos de los mismos muy diversa que comprende los emparejamientos de clase VH y VL más prevalentes y/o preferidos. Usando esta información, el experto en la materia puede generar un alto grado de diversidad sin sacrificar los beneficios clave atribuibles a las combinaciones de parejas clase VH y VL más prevalentes y/o preferidas. Antes de la presente descripción, nadie había aclarado los emparejamientos de clase VH y VL de mayor prevalencia y/o preferidos, ni había intentado beneficiarse de ese conocimiento en técnicas de generación de genotecas. Esta metodología, por lo tanto, proporciona colecciones completas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que representan el sistema inmune humano no activado.
- 15 20 Utilizando el diseño de colecciones y los métodos de presentación descritos en este documento, se pueden generar colecciones con gran diversidad, ya que algunas realizaciones comprenden colecciones de al menos 1×10^{10} miembros.
- 25 En algunos aspectos, la presente descripción permite vectores y células hospedadoras que comprenden las colecciones descritas de ácidos nucleicos.
- 30 En algunos aspectos, la presente descripción permite métodos para producir tales colecciones.
- 35 En algunas realizaciones, las secuencias de ADN no activadas representativas del repertorio inmune humano, se obtienen en una etapa distinta, y se almacenan en una base de datos; por lo tanto, el diseño de una colección se puede modificar fácilmente, optimizar y personalizar *in silico*, lo que permite un nivel de personalización que normalmente se puede obtener en una genoteca sintética.
- 40 En algunos aspectos, la presente descripción permite métodos de identificación de anticuerpos o de fragmentos de los mismos utilizando las colecciones descritas.
- 45 En algunos aspectos, la presente descripción se dirige a colecciones o genotecas que codifican anticuerpos, o a fragmentos de los mismos, que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que son abundantes y/o preferidas en el repertorio inmune. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos son variantes de los mismos de la línea germinal, sustancialmente de la línea germinal o de codón optimizado. Tales colecciones o genotecas pueden comprender las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que tienen propiedades biofísicas ventajosas, incluyendo presentación elevada en fagos; expresión elevada en *E. coli* en formato Fab; expresión elevada en células de mamífero en formato IgG; termoestabilidad elevada; estabilidad en suero; poca tendencia a la agregación (es decir, alta solubilidad); y poco riesgo de inmunogenicidad. En algunas realizaciones, las colecciones o las genotecas pueden comprender las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que existen en el repertorio inmune humano no activado. Realizaciones relacionadas incluyen métodos de preparación y de empleo de tales colecciones.
- 50 En algunos aspectos, la presente descripción se dirige a colecciones o genotecas que codifican anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que son abundantes y/o preferidos en el repertorio inmune junto con las parejas de clase VH/VL que son abundantes y/o preferidas en el repertorio inmune. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos son de la línea germinal, sustancialmente de
- 55

la línea germinal o de variantes con codones optimizados de los mismos. Tales colecciones o genotecas pueden comprender las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL y/o las parejas de clase VH/VL que tienen propiedades biofísicas ventajosas, incluyendo presentación elevada en fagos; expresión elevada en *E. coli* en formato Fab; expresión elevada en células de mamífero en formato IgG; termoestabilidad elevada; estabilidad en suero; poca tendencia a la agregación (es decir, alta solubilidad); y poco riesgo de inmunogenicidad. En algunas realizaciones, las colecciones o las genotecas pueden comprender las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL y/o parejas de clase VH/VL que existen en el repertorio inmune humano no activado. Realizaciones relacionadas incluyen métodos de preparación y uso de tales colecciones.

Por consiguiente, la presente descripción incluye colecciones de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos, sustancialmente representativas de un repertorio inmune, en donde cada anticuerpo o fragmento del mismo comprende una pareja de clase VH/VL, en donde sustancialmente representativa de un repertorio inmune es que cada pareja de clase VH/VL presente en la colección es una pareja de clase VH/VL presente en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune. El repertorio inmune puede ser de un individuo o una población, y puede estar sin activar. Un repertorio inmune de este tipo se puede determinar como el de las parejas de clase VH/VL en al menos 1×10^5 linfocitos B procedentes de un individuo; las parejas de clase VH/VL en al menos 1×10^5 linfocitos B procedentes de una población de individuos; o las parejas de clase VH/VL presentes en al menos 1×10^5 anticuerpos, por ejemplo. El repertorio inmune puede ser el de linfocitos B no activados o de linfocitos B con experiencia con antígenos. El individuo o la población pueden ser humanos. El repertorio inmune se puede determinar mediante el análisis de bases de datos disponibles públicamente y/o de la bibliografía.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos son sintéticos, tales como, los generados por síntesis génica total. En realizaciones relacionadas, los ácidos nucleicos son secuencias de la línea germinal; sustancialmente secuencias de la línea germinal; o variantes con codones optimizados de la línea germinal o sustancialmente secuencias de la línea germinal. En algunas realizaciones, al menos, una de las CDRs está muy diversificada.

En algunas realizaciones, la colección de la presente descripción comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos en donde FR1, FR2 y FR3 tanto de la VH como de VL comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de clase VH y VL que tienen características preferidas. Lo más preferiblemente, la colección de la presente descripción comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos, en donde FR1, FR2 y FR3 tanto de VH como de VL comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de clase VH y VL que tienen características preferidas, en donde la CDR3 de VH y VL está altamente diversificada.

En realizaciones relacionadas, la colección de dichos ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos se clona en un vector. Los vectores adecuados son conocidos en la técnica, e incluyen vectores de presentación, tales como vectores de presentación en fagos, vectores de plásmidos, vectores fagémidos, vectores de expresión, incluyendo vectores de expresión bacteriana o de mamífero. En otras realizaciones relacionadas, la colección, o la colección clonada en vectores, se transforma en células hospedadoras. Por lo tanto, la invención incluye una colección de células hospedadoras. Las células hospedadoras adecuadas incluyen células hospedadoras procariontas (tales como *E. coli*) y células hospedadoras eucariotas (tales como células hospedadoras de mamífero).

En otra realización, la descripción se refiere a una base de datos que comprende parejas de clase VH/VL de ~1345 linfocitos B humanos no activados o procedentes de secuencias disponibles públicamente en un soporte legible. Una base de datos de este tipo es útil para el diseño y la construcción de la colección y las genotecas de la invención.

La invención también incluye métodos para producir una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos sustancialmente representativos de un repertorio inmune. El repertorio inmune puede ser el de linfocitos B no activados o de linfocitos B con experiencia con antígenos de un ser humano o seres humanos. Un método de este tipo puede comprender las siguientes etapas: (a) identificar parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune; (b) sintetizar una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune.

La etapa de identificación puede llevarse a cabo de diferentes maneras. Por ejemplo, la identificación de parejas de clase VH/VL puede comprender el aislamiento de linfocitos B no activados procedentes de uno o varios hospedadores humanos y la determinación de las parejas de clase VH/VL en cada uno de los linfocitos B mediante el aislamiento y la secuenciación del ADN, ARNm o ADNc que codifica las parejas de clase VH/VL, o sometiendo a ensayo con una o varias sondas de ácido nucleico, específicas para cada VH y VL, y luego analizando las parejas de clase VH/VL. En una realización alternativa o complementaria, las parejas de clase VH/VL se pueden determinar a partir de bases de datos preexistentes, tales como bases de datos de secuencias de anticuerpos. En una realización alternativa o complementaria, las parejas de clase VH/VL se pueden identificar a partir de la bibliografía. Por lo tanto, en una realización, la descripción comprende obtener secuencias de ácidos nucleicos de anticuerpos (ya sea preexistentes o generadas de nuevo), determinar las parejas de clase VH/VL mediante alineación de secuencias y cotejar

tales secuencias para identificar parejas de clase VH/VL presentes en el repertorio inmune.

En algunas realizaciones, el método se utiliza para crear colecciones en las que la mayoría de los miembros tienen propiedades biofísicas favorables que facilitan la producción y expresión de anticuerpos o de fragmentos de los mismos (tales como en fagos, o a partir de células), y producir anticuerpos que son solubles, térmicamente estables.

5 Más particularmente, tales propiedades incluyen: (i) presentar de manera eficaz en fagos; (ii) presentar de manera eficaz en células de mamífero (iii) expresar de manera adecuada en *E. coli* en formato Fab; (iv) expresar de manera adecuada en células de mamífero en un formato IgG; v) estabilidad térmica; (vi) solubilidad; y (vii) baja inmunogenicidad. Mediante la determinación de las parejas de clase VH/VL que tienen algunas o la totalidad de estas propiedades, se puede construir entonces una colección en la que la mayoría de los miembros tienen tales propiedades biofísicas, como sintetizando solo los ácidos nucleicos con tales propiedades. Por consiguiente, la descripción incluye una colección de este tipo, y métodos para preparar una colección de este tipo.

10 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos sintetizados son de la línea germinal, sustancialmente de la línea germinal o variantes con codones optimizados de los mismos. La variación se puede introducir en al menos una región determinante de complementariedad (CDR). Cualquier CDR es apropiada, especialmente la CDR3. Preferiblemente, la variación de la secuencia añadida a la CDR se limita a secuencias en marco y exentas de cisteínas y codones de parada, asegurando de este modo que todos los miembros de la genoteca se expresan correctamente.

15 Una vez que se han sintetizado los ácidos nucleicos, se pueden clonar en un vector (tal como un vector de presentación, un vector de presentación en fagos; un vector fagémido; o un vector de expresión en mamíferos), y pueden transformarse en una célula hospedadora. Las células hospedadoras adecuadas incluyen células procariontas hospedadoras (por ejemplo, *E. coli*) y células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, células hospedadoras de mamífero).

20 En otras realizaciones, la descripción proporciona métodos para identificar un anticuerpo específico de un inmunógeno. Tal método puede comprender, en una realización, la identificación de parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune; la síntesis de una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune; la presentación o expresión del anticuerpo o de un fragmento del mismo procedente de la colección; el escrutinio de la colección en busca de un inmunógeno específico; y la selección de al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo específico para dicho inmunógeno. Ya que los métodos y las colecciones descritas en esta memoria se pueden construir con respecto a propiedades biofísicas favorables, los métodos y las colecciones son particularmente útiles para la identificación de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo para el tratamiento de una enfermedad o una afección, preparando una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos con tales propiedades favorables, y escrutinando en busca de un inmunógeno específico para identificar anticuerpos que se unen a un inmunógeno de este tipo.

35 En algunos aspectos, la descripción se refiere a colecciones o genotecas de anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de VH/VL. En algunas realizaciones, las colecciones o genotecas de anticuerpos o fragmentos de los mismos comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que son abundantes en un repertorio inmune. En algunas realizaciones, la descripción se dirige a colecciones o genotecas de anticuerpos o de fragmentos de los mismos que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que tienen ciertas características biofísicas favorables. En algunas realizaciones, las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL son los que están presentes de forma natural en el repertorio inmune, y se encuentran entre los más abundantes o frecuentes en el repertorio. En algunas realizaciones, las colecciones o genotecas de anticuerpos o fragmentos de los mismos comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL. En algunas realizaciones, las colecciones o genotecas de anticuerpos o fragmentos de los mismos comprenden las regiones estructurales y/o regiones de CDR procedentes de la línea germinal, sustancialmente de la línea germinal o de codones optimizados de las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL. En algunas realizaciones, las colecciones o genotecas de anticuerpos o de fragmentos de los mismos comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que son sintéticos, estando contruidos mediante síntesis génica total. En algunas realizaciones, las colecciones o genotecas de anticuerpos o fragmentos de los mismos comprenden porciones de las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que son sintéticos, estando contruidos mediante síntesis génica total. En algunas realizaciones, las colecciones o genotecas de anticuerpos o fragmentos de los mismos comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que tienen propiedades biofísicas favorables que ayudan en la detección y el posterior desarrollo de los anticuerpos, especialmente en el contexto terapéutico. Las propiedades biofísicas favorables incluyen, pero no se limitan a (i) se presentan de forma adecuada en fagos en el formato Fab, (ii) se presentan de forma adecuada en células de mamíferos en el formato IgG (iii) se expresan en grandes cantidades en formato Fab, por ejemplo, en *E. coli*, y en formatos IgG, por ejemplo, en células de mamífero, (iv) son termodinámicamente estables; (v) tienen una estabilidad elevada en suero, (vi) tienen poca tendencia a la agregación (es decir, solubilidad elevada); y (vii) tienen poco riesgo de inmunogenicidad.

En otros aspectos, las colecciones de la presente descripción comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas preferidas de clase VH y VL. Las colecciones de la presente descripción comprenden preferiblemente anticuerpos o fragmentos de los mismos, en donde una o varias regiones estructurales comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las parejas de clase VH y VL que tienen características preferidas, especialmente en donde FR1, FR2 y FR3 tanto de VH como de VL comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de clase VH y VL que tienen características preferidas. Las CDRs pueden estar altamente diversificadas. Preferiblemente, la CDR3 tanto de VH como de VL está muy diversificada. En algunas realizaciones, la CDR1 y CDR2 de VH y/o VL son de la línea germinal o sustancialmente de la línea germinal en la secuencia.

Esta estrategia aumenta la probabilidad de que las colecciones de la presente descripción comprendan anticuerpos o fragmentos de los mismos contra cualquier inmunógeno, que se pueden desarrollar para uso terapéutico, ya que la mayoría de los anticuerpos o fragmentos de los mismos presentes en las colecciones comprenden las secuencias de la línea germinal de las parejas de VH y VL que tienen las características preferidas anteriores. Los anticuerpos seleccionados también tendrán una inmunogenicidad disminuida y una afinidad elevada hacia el antígeno específico. El resultado es una probabilidad muy incrementada de que anticuerpos o fragmentos de los mismos que se seleccionan a partir de las colecciones descritas, sean altamente eficaces contra cualquier inmunógeno y se puedan desarrollar para fines terapéuticos o de diagnóstico.

Tales colecciones superan muchos de los problemas de la técnica anterior. Por ejemplo, en una genoteca de cognados obtenida a partir de linfocitos B, los emparejamientos de clase VH y VL presentes en la genoteca son dependientes de los emparejamientos de clase presentes en la muestra. Si se toma una muestra suficientemente grande de linfocitos B, estarán presentes cada una de las aproximadamente 50 VH y 50 VL combinaciones de emparejamientos de clase (~2500). La presencia de tantas parejas de clase VH y VL se puede equiparar al ruido de fondo. Puede ser deseable generar genotecas de gran diversidad que comprenden solo las parejas más prevalentes de clase VH y VL pero, con una metodología de genoteca de cognados, esto no es posible.

Además, en algunas realizaciones, las secuencias de ADN a partir de las cuales se basan las colecciones, se obtienen a partir de muestras de linfocitos B no activados que no tienen experiencia con antígenos, por lo tanto, los miembros expresados no tienen tendencia hacia un inmunógeno particular y las colecciones se pueden utilizar para escrutar en busca de cualquier inmunógeno.

Por consiguiente, las secuencias de ácidos nucleicos (o una parte seleccionada de las mismas) que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos obtenidos a partir de linfocitos B no activados (sin experiencia con antígenos) procedentes de hospedadores humanos, se pueden secuenciar. A partir de estos datos de secuencias, se pueden identificar emparejamientos de clase de la cadena VH/VL de la familia de la línea germinal, representados predominantemente en el repertorio inmune. Basándose en ciertos criterios, como la prevalencia, se seleccionan las parejas de clase de la cadena pesada y ligera para su incorporación a las colecciones. Las colecciones se pueden sintetizar a continuación mediante síntesis génica. En algunas realizaciones, las colecciones sintéticas comprenden sustancialmente regiones estructurales VH y VL de la línea germinal, en donde las CDRs están diversificadas.

Empleando las secuencias de ADN obtenidas a partir de, por ejemplo, linfocitos B no activados (sin experiencia con antígenos) procedentes de hospedadores humanos o de bases de datos disponibles públicamente o de la bibliografía, como "molde", la presente descripción permite métodos para identificar las familias y/o genes y/o parejas de clase más prevalentes de la línea germinal de VH y VL. De nuevo, la abundancia relativa de las familias y/o genes y/o parejas de clase de la línea germinal de VH y VL se ha dilucidado, anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o genes y/o parejas de clase de la línea germinal de VH y VL se pueden someter a ensayo para estudiar las siguientes características preferidas: (i) se presentan de forma adecuada en fagos en el formato Fab, (ii) se expresan en grandes cantidades y en forma soluble en formato Fab y en formatos IgG (iii) y son termodinámicamente estables. Al someter a ensayo las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias y/o los genes y/o las parejas de clase más prevalentes de la línea germinal de VH y VL, las que tienen características preferidas se pueden identificar. Usando esta información, el experto en la materia puede generar un alto grado de diversidad sin sacrificar los beneficios clave atribuibles a las familias y/o los genes y/o las combinaciones de parejas de clase VH y VL más prevalentes de la línea germinal.

Utilizando el diseño de colecciones y los métodos de presentación descritos en este documento, se pueden generar colecciones de gran diversidad, ya que algunas realizaciones comprenden colecciones de al menos 1×10^{10} miembros.

La presente descripción se refiere en general a colecciones de anticuerpos sintéticos que comprenden la pareja de clase VH y VL que tiene las características más preferidas. En algunas realizaciones, las colecciones comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias VH y VL representadas por la pareja de clase.

La presente descripción se refiere en general a colecciones de anticuerpos sintéticos que comprenden una o varias parejas de clase VH y VL que tienen las características preferidas. En algunos aspectos, las colecciones compren-

den las secuencias de proteínas de la línea germinal codificadas por las familias VH y VL representadas por la pareja de clase.

5 En algún aspecto, la presente descripción permite métodos para identificar los genes de la línea germinal de VH y VL que son más prevalentes en un repertorio inmune, someter a ensayo los anticuerpos que tienen las secuencias de los genes más prevalentes de la línea germinal de VH y VL para identificar los genes de la línea germinal de VH y VL que tienen características preferidas y a continuación, generar colecciones que comprenden las clases VH y VL preferidas. La presente descripción permite métodos para identificar las parejas de clase VH y VL en el repertorio inmune humano, que pueden estar sin activar, determinar las parejas de clase VH y VL que son más prevalentes, someter a ensayo las parejas de clase VH y VL para identificar parejas de clase VH y VL que tienen características preferidas y a continuación generar colecciones que comprenden las parejas de clase VH y VL preferidas y/o anticuerpos obtenidos a partir de los genes preferidos de la línea germinal de VH y VL. Una vez que se identifican VH y VLs y/o las parejas de clase de VH y VL, a continuación, se identifican sus respectivas secuencias de la línea germinal, de manera que las secuencias de la línea germinal se pueden incorporar en el diseño de una colección.

15 En algunos aspectos, la presente descripción permite vectores y células hospedadoras que comprenden las colecciones de ácidos nucleicos descritas.

En algunos aspectos, la presente descripción permite métodos para producir tales colecciones.

20 En algunas realizaciones, las secuencias de ADN representativas del repertorio inmune humano se obtienen en una etapa distinta, y se almacenan en una base de datos; por lo tanto, el diseño de la colección se puede modificar, optimizar y personalizar fácilmente *in silico*, lo que permite un nivel de personalización que normalmente se puede realizar en una genoteca sintética.

En algunos aspectos, la presente descripción permite métodos para identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos utilizando las colecciones descritas.

Métodos, ácidos nucleicos, proteínas, vector, célula hospedadora

25 En un aspecto, la presente descripción permite colecciones de ácidos nucleicos producidas por síntesis génica total. La tecnología de síntesis génica ha avanzado considerablemente en los últimos años y se pueden generar colecciones muy grandes de ácidos nucleicos. Las siguientes empresas ofrecen este tipo de servicios de síntesis: Entelchon (Regensburg, Alemania), GeneArt (Regensburg, Alemania) y Sloning Biotechnology (Puchheim, Alemania). Para que una empresa de síntesis génica genere una colección, se pueden proporcionar las secuencias de cada miembro de la colección.

30 En algunas realizaciones, la presente descripción permite una colección de ácidos nucleicos sintéticos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 0,05% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En otras realizaciones, las colecciones de la presente descripción comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 1% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En otras realizaciones, las colecciones de la presente descripción comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 1,5% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En otras realizaciones, las colecciones de la presente descripción comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 2% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En otras realizaciones, las colecciones de la presente descripción comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 3% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En otras realizaciones, las colecciones de la presente descripción comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 4% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En otras realizaciones, las colecciones de la presente descripción comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 5% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B.

40 En algunas realizaciones, la presente descripción permite colecciones, en donde las parejas de clase VH y VL se identifican a partir de linfocitos B aislados a partir de un hospedador humano. En algunas realizaciones, los linfocitos B no están activados. En algunas realizaciones, las colecciones de ácidos nucleicos codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden regiones estructurales de VH y VL de la línea germinal. En una realización preferida, se sintetizan colecciones de ácidos nucleicos para incluir regiones estructurales de la línea germinal de VH y VL con CDRs diversificadas. Regiones estructurales de la línea germinal son deseables como anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden regiones estructurales de la línea germinal que no es probable que sean inmunogénicas.

55 Utilizando los métodos de diseño y presentación de colecciones descritos en este documento, se pueden generar colecciones de gran diversidad, ya que algunas realizaciones comprenden colecciones de al menos 1×10^4 secuencias de ácidos nucleicos, algunas realizaciones comprenden colecciones de al menos 1×10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} secuencias de ácidos nucleicos. Esta diversidad se genera mediante la síntesis de colecciones que comprenden miembros que comprenden las parejas prevalentes de clase VH y VL con CDRs diversificadas.

Las colecciones de la presente descripción se diseñan a partir de datos de secuencias sustancialmente representativas de un repertorio inmune. En algunas realizaciones, los datos de la secuencia se obtienen mediante la búsqueda en listas de secuencias de inmunoglobulinas disponibles públicamente. Por ejemplo, en NCBI se pueden buscar usando Ig-Blast o la bibliografía disponible al público. A partir de 2005 la base de datos contenía al menos 25.000 secuencias reordenadas de anticuerpos humanos en formato FASTA. De las 22.500 entradas de datos, 13.235 representaban secuencias de VH, 1.506 representaban V κ y 2.259 representaban V λ . De las secuencias, VH, V κ y V λ se pueden clasificar en sus respectivas familias y/o genes de la línea germinal. Como algunas de las Ig-Blast incluyen secuencias de anticuerpos completos, las familias y/o los genes correctos de la línea germinal de cada emparejamiento de clase del dominio VH y VL se puede determinar a partir de las secuencias de la base de datos. Si se utiliza esta metodología, se puede determinar la importancia de cada familia y/o gen de la línea germinal de VH y VL, y/o la familia y/o gen de la línea germinal de cada pareja de clase del dominio VH y VL puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. La selección de qué pareja de VH y VL y/o de clase VH y VL se va a incorporar en la genoteca, se puede lograr según una variedad de modos. En algunas realizaciones, la VH y VL de mayor prevalencia se selecciona para su incorporación en la colección o genoteca. En algunas realizaciones, la VH y las VLs que tienen propiedades biofísicas favorables, se seleccionan para su incorporación en la colección o genoteca. En algunas realizaciones, se seleccionan las parejas de clase VH y VL que tiene la prevalencia más alta para su incorporación en la colección o genoteca. En algunas realizaciones, se seleccionan las parejas de clase VH y VL que tienen propiedades biofísicas favorables para la incorporación en la colección o genoteca. En algunas realizaciones, tanto la VH como las VLs que tienen la prevalencia más alta y/o propiedades biofísicas favorables y/o las parejas de clase VH y VL que tienen la prevalencia más alta y/o parejas de clase VH y VL que tienen propiedades biofísicas favorables, se seleccionan para su incorporación en la colección o genoteca.

Uno de los inconvenientes de esta metodología es que las bases de datos disponibles públicamente se llenan frecuentemente con secuencias de anticuerpos generados contra inmunógenos específicos, por tanto, las secuencias están sesgadas. Además, en la mayoría de las bases de datos, las secuencias de la cadena pesada y ligera no están enlazadas, por lo tanto, el emparejamiento de clases VH y VL no se puede identificar.

En algunas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos se obtienen mediante la recogida de linfocitos B a partir de uno o varios hospedadores; aislando el ADN a partir de los linfocitos B y, preferiblemente, secuenciado el ADN. Preferiblemente, los linfocitos B no están activados. Las muestras de linfocitos B se recogen a partir de uno o más donantes humanos. Lo siguiente es una técnica que se puede utilizar para aislar linfocitos B. Linfocitos B en reposo (linfocitos B) se aíslan a partir de bazo mediante el uso de una selección negativa contra otros tipos de células con anticuerpos monoclonales anti-CD43 y anti-Mac-1/CD1, por ejemplo, a través de microperlas magnéticas. Esta estrategia reduce las células que no son linfocitos B a partir de una población mixta de esplenocitos y se basa en el hecho de que los leucocitos más maduros, con la excepción de los linfocitos B esplénicos en reposo, expresan CD43 (de hecho, la expresión de CD43 ha sido demostrada en linfocitos B inmaduros, células plasmáticas y algunas células maduras, además de granulocitos, monocitos, macrófagos, plaquetas, células citotóxicas (NK), timocitos y linfocitos T periféricos CD8+ y la mayoría de los CD4+). Microperlas anti-Mac-1/CD11b se incluyen en la selección negativa para mejorar la eliminación de las células mieloides. El aislamiento de linfocitos B se puede automatizar mediante el uso de un clasificador automático de células con perlas magnéticas AutoMACS (Miltenyi Biotec). Según se determina con el análisis de fluorescencia de células B220+, tal aislamiento produce rutinariamente aproximadamente 4×10^7 linfocitos B por bazo que tienen una pureza > 95%. Véase también Miltenyi S, Muller W, Weichel W, y Radbruch A. (1990) Cytometry 11(2), 231-238.

El número de linfocitos B recogidos representa sustancialmente el repertorio inmune. En algunas realizaciones al menos 1×10^4 linfocitos B se aíslan a partir de un hospedador, más preferiblemente al menos 10^5 linfocitos B; más preferiblemente al menos 10^6 linfocitos B; más preferiblemente 10^7 linfocitos B se aíslan a partir de un hospedador.

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

El ADNc se puede amplificar selectivamente a partir del ARNm aislado mediante una transcripción inversa usando cebadores específicos, seguida de PCR convencional. Los cebadores específicos se utilizan para amplificar ácidos nucleicos de dominios de cadena pesada y ligera variables. Véase Cancer Surv. 1997;30:21-44, J Clin. Pathol. 1994; 47:493-6, J. Clin. Pathol. 1990; 43:888-90 o Mol. Pathol. 2002 Abril; 55(2): 98-101.

El ADN que codifica los dominios de la cadena ligera y variable de un linfocito B, se mantienen juntos de modo que se puede identificar el emparejamiento de clase de la cadena pesada y ligera del dominio variable. Las técnicas para el aislamiento de ácidos nucleicos que codifican emparejamientos de dominios variables a partir de linfocitos B individuales, son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, los documentos WO01/92291; WO92/15678; WO93/03151, WO2005/042774; Mullinax RL et al., 1992 Biotechniques 12:6 864-868; Chapal, N. et al. 1997 Bio-

techniques 23, 518-524, Embleton MJ et al., 1992 Nucleic Acids Res. 20:15, 3831-3837; Coronella, J.A. et al. 2000 Nucleic Acids Res. 28:20, E85; Thirion S et al., 1996 European Journal of Cancer Prevention 5:6 507-511; y Wang, X et al. 2000 J. Immunol. Methods 20, 217-225.

5 Estas técnicas se pueden utilizar de forma aislada o en combinación con otros métodos. Por ejemplo, si secuencias del dominio variable de la cadena pesada y ligera de una gran muestra no se identifican con éxito a partir de sus linfocitos B respectivos, entonces se puede completar el siguiente método, con el fin de identificar las parejas de clase correctas del dominio pesado variable y ligero variable. Se completa una PCR para una sola célula de cada linfocito B individual.

10 Preferiblemente, se secuenció el ADN de cada uno de los linfocitos B. Existen varias empresas que son capaces de secuenciar genomas enteros, como Helicos BioSciences (Cambridge, MA, EE.UU.). Con su tecnología True Single Molecule Sequencing[®], Helicos es capaz de secuenciar directamente moléculas individuales de ADN o ARN con gran velocidad y eficacia. Otras empresas capaces de realizar esfuerzos similares con secuencias incluyen Illumina (San Diego, CA, EE.UU.; Solexa system) y Roche (Basilea, CH, sistema 454). No se requieren etapas de clonación antes de la secuenciación.

15 En otro aspecto, la descripción permite métodos para identificar la familia de la línea germinal de las parejas de dominios variables de la cadena ligera y la pesada presentes en el repertorio inmune. En todos los anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede rastrear el origen de su familia de la línea germinal usando métodos conocidos por un experto en la técnica. Mediante el análisis de la secuencia de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo, la familia de la línea germinal tanto de VH como de VL se puede determinar por métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, Wildt et. al, (1999), sometieron a ensayo linfocitos B procedentes de 3 pacientes e identificaron 365 emparejamientos de clase VH y VL. El ARN de cada linfocito B se utilizó para la síntesis de ADNc y el ADNc que codificaba las regiones VH y VL fue amplificado con PCR y se secuenció. Como se muestra en la Fig. 1 de Wildt, ciertas clases de VH y VLs se emparejaban con más frecuencia que otras, por ejemplo, VH3-8 con Vk3-1, Vk3-19, Vk4-1, Vλ2-3 o Vλ1-2 y VH3-9 con Vk3-1, Vk3-3 o Vλ1-5.

25 En otro aspecto, la descripción permite métodos para diseñar regiones determinantes de complementariedad diversificadas antes de la síntesis de la colección. Las CDRs se pueden diseñar por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en Knappik et al. 2000; documento WO 97/08320.

30 En otro aspecto, la descripción permite métodos para seleccionar los emparejamientos de clases de dominios variables deseados para que se incluyan en las colecciones de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, una colección de ácidos nucleicos se sintetiza de modo que comprende todas las parejas de clases de dominios VH y VL identificadas por los métodos descritos.

35 Además, la prevalencia de las parejas de clase VH y VL se puede determinar mediante diversas pruebas estadísticas. En su forma más sencilla, las parejas individuales de clase VH y VL simplemente se cuentan. Pruebas estadísticas más sofisticadas pueden tener en cuenta otros parámetros diversos. A modo de ejemplos no limitativos, las siguientes pruebas estadísticas y referencias pueden orientar como ejemplos de las numerosas metodologías que se han realizado en un análisis de este tipo o similar: Bayesian Shrinkage Estimation (véase, p. ej., Biometrics 59 (2003): 476-486), DADA (Digital Analysis of cDNA Abundance, véase, p. ej., BMC Genomics 2002, 3:7), modelado lineal (Pacific Symposium on Biocomputing, 1999, 4:41-52) y diversos métodos de agrupación (BMC Bioinformatics 2006, 7:397, Fourth IEEE International Conference on Data Mining (ICDM'04), páginas 403-406).

40 En otros aspectos, la presente descripción permite una colección de vectores que comprenden las colecciones de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los vectores comprenden vectores de expresión, vectores de presentación, vectores de presentación en fagos o vectores fagémidos.

45 Los vectores de expresión eucariotas son bien conocidos en la técnica y también están disponibles comercialmente. Típicamente, tales vectores se proporcionan conteniendo sitios de restricción convenientes para la inserción del ADN deseado. Ejemplos de tales vectores incluyen pSVL y pKSV-1 0, pBPV-1/PML2d y pTDT1 (ATCC, nº 31255).

50 En otros aspectos, la presente descripción permite una colección de células hospedadoras transformadas con la colección de vectores descrita. Las células hospedadoras pueden ser procariotas o eucariotas. Se prefieren las células bacterianas como células hospedadoras procariotas y, normalmente, son una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*), tal como, por ejemplo, la cepa de *E. coli* DH5, disponible en Bethesda Research Laboratories, Inc., Bethesda, Md. Las células hospedadoras eucariotas preferidas incluyen levadura y células de mamífero que incluyen de murino y roedores, preferiblemente células de vertebrados tales como las procedentes de una línea celular de ratón, rata, mono o humana.

55 La introducción de vectores en células hospedadoras puede llevarse a cabo a través de una variedad de métodos de transformación o transfección, conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo precipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, fusión fantasma de glóbulos rojos, fusión de protoplastos, infección vírica y similares. La producción de anticuerpos monoclonales de longitud completa, fragmentos Fab, fragmentos Fv y fragmentos scFv, es bien conocida.

La transformación de los hospedadores celulares apropiados con una molécula de ADN recombinante se lleva a cabo por métodos que dependen típicamente del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de células hospedadoras procariotas, véase, por ejemplo, Cohen et al., *Proceedings National Academy of Science*, EE.UU., vol. 69, pág. 2110 (1972); y Maniatis et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982). En relación con la transformación de células de vertebrados con vectores retrovíricos que contienen ADN_r, véase por ejemplo, Sorge et al., *Mol. Cell. Biol.*, 4:1730-1737 (1984); Graham et al., *Virology*, 52:456 (1973); y Wigler et al., *Proceedings National Academy of Sciences*, EE.UU., vol. 76, pág. 1373-1376 (1979).

En otro aspecto, la descripción permite un kit, o una base de datos, que comprende datos de secuencias que ilustran ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden ácidos nucleicos presentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B humanos no activados, en donde dichos datos de secuencias están en un soporte legible.

En otro aspecto, la descripción permite un método para producir una colección de ácidos nucleicos sintéticos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos, que comprende la síntesis de una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 0,05% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos -2500 linfocitos B. En algunas realizaciones, la descripción permite un método para producir una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos sustancialmente representativos de un repertorio inmune que comprende: (a) la identificación de parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune; (b) sintetizar una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH/VL en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune. En algunas realizaciones, la identificación de parejas de clase VH/VL comprende: (i) aislar linfocitos B a partir de uno o varios hospedadores humanos; (ii) determinar las parejas de clase VH/VL en cada uno de los linfocitos B mediante un proceso seleccionado entre: (A) aislar y secuenciar el ADN, ARNm o ADNc que codifica las parejas de clase VH/VL; o (B) examinar con una o varias sondas de ácido nucleico específicas para cada VH y VL; y (iii) analizar las parejas de clase VH/VL. En algunas realizaciones, la identificación de parejas de clase VH/VL comprende: (i) obtener secuencias de ácido nucleico de anticuerpos, (ii) determinar parejas de clase VH/VL mediante alineación de secuencias; (iii) cotejar tales secuencias procedentes de al menos 100 anticuerpos, para identificar parejas de clase VH/VL presentes en el repertorio inmune. En algunas realizaciones, los métodos comprenden la selección de parejas de clase VH/VL que muestran al menos una propiedad biofísica seleccionada a partir del grupo que consiste en: (i) presentación eficaz en fagos; (ii) presentación eficaz en células de mamífero; (iii) expresión adecuada en *E. coli* en formato Fab; (iv) expresión adecuada en células de mamífero en un formato IgG; (v) estabilidad térmica; (vi) solubilidad; y (vii) poca inmunogenicidad; y la síntesis de una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que muestran al menos una de las propiedades biofísicas. En algunas realizaciones, la colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos, es de la línea germinal, sustancialmente de la línea germinal o de variantes con codones optimizados de ácidos nucleicos de la línea germinal. En algunas realizaciones, durante la síntesis de una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH/VL, se introduce una variación de secuencia en al menos una región determinante de complementariedad (CDR). En algunas realizaciones, la variación de secuencia se limita a secuencias exentas de codones de parada. En algunas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente la clonación de la colección de ácidos nucleicos en un vector. En algunas realizaciones, el vector se selecciona a partir del grupo que consiste en: (i) un vector de presentación, (ii) un vector de presentación en fagos; (iii) un vector fagémido; y (iv) un vector de expresión en mamífero. En algunas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente la transformación en una célula hospedadora. En algunas realizaciones, las células hospedadoras se seleccionan a partir del grupo que consiste en: (i) células hospedadoras procariotas; (ii) células hospedadoras eucariotas; (iii) células hospedadoras de *E. coli*; y (iv) células hospedadoras de mamífero.

Algunas realizaciones comprenden adicionalmente insertar dichos ácidos nucleicos en una colección de vectores y transformar/transfectar en una célula hospedadora y presentar los anticuerpos o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los vectores son vectores de expresión, vectores de presentación, tales como un vector fagémido. Algunas realizaciones comprenden adicionalmente transfectar dichos vectores en una célula hospedadora adecuada. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es procariota, tal como *E. coli* o eucariota tal como de mamífero.

En otro aspecto, la descripción permite un método para identificar un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos del mismo, específico de un inmunógeno, que comprende las etapas de sintetizar una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 0,05% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos -2500 linfocitos B; escrutar la colección en busca de un inmunógeno específico; y seleccionar uno o varios anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos de dicho inmunógeno. Algunas realizaciones comprenden un método para identificar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, específico de un inmunógeno, que comprende las etapas de: (a) identificar parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune; (b) sintetizar una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio in-

5 mune; (c) presentar o expresar el anticuerpo o un fragmento del mismo procedente de la colección; (d) escrutar la colección en busca de un inmunógeno específico; y (e) seleccionar al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo, específico de dicho inmunógeno. Algunas realizaciones comprenden un método para identificar un anticuerpo o un fragmento del mismo para el tratamiento de una enfermedad o una afección, que comprende las etapas de: (a) 5 identificar parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune; (b) identificar parejas de clase VH/VL que muestran al menos una propiedad biofísica seleccionada a partir del grupo que consiste en: (i) presentación eficaz en fagos; (ii) presentación eficaz en células de mamífero; (iii) expresión adecuada en *E. coli* en formato Fab; (iv) expresión adecuada en células de mamífero en un formato IgG; (v) estabilidad térmica; (vi) solubilidad; y (vii) inmunogenicidad reducida; (c) 10 sintetizar una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH/VL presentes en una concentración de al menos 0,05%, en al menos 1% o al menos 2% de las parejas de clase VH/VL en el repertorio inmune y presentar al menos una propiedad biofísica de (i) - (vii); (d) presentar o expresar el anticuerpo o un fragmento del mismo procedente de la colección; (e) escrutar la colección en busca de un inmunógeno específico asociado con la enfermedad o la afección; y (f) seleccionar al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo específico para dicho inmunógeno. 15

En algunas realizaciones, los linfocitos B se aíslan a partir de un hospedador humano. En algunas realizaciones, los linfocitos B no están activados. En algunas realizaciones, las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^4 ~2500 linfocitos B se identifican por un método que comprende recoger linfocitos B no activados a partir de uno o más hospedadores humanos; aislar el ADN de los linfocitos B recogidos; y analizar el ADN aislado. En algunas realizaciones, la etapa de analizar el ADN comprende la secuenciación del ADN. En algunas realizaciones, la etapa de analizar el ADN comprende además la identificación de la frecuencia con la que cada pareja de clase VH y VL aparece en la muestra. 20

Algunas realizaciones comprenden además la inserción de dichos ácidos nucleicos en una colección de vectores y la transformación/transfección en una célula hospedadora, y la presentación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos. 25

En otro aspecto, la descripción permite un método de identificación de un anticuerpo o fragmentos del anticuerpo específicos de un inmunógeno, que comprende las etapas de sintetizar una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprende parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 0,05% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos ~2500 linfocitos B; escrutar la colección en busca de un inmunógeno específico; y seleccionar uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos de dicho inmunógeno. 30

En algunas realizaciones, los linfocitos B se aíslan a partir de un hospedador humano. En algunas realizaciones, los linfocitos B no están activados. En algunas realizaciones, las parejas de clase VH y VL en una muestra de al menos ~2500 linfocitos B se identifican por un método que comprende recoger los linfocitos B a partir de uno o varios hospedadores humanos; aislar el ADN a partir de los linfocitos B recogidos; y analizar el ADN aislado. En algunas realizaciones, la etapa de analizar el ADN comprende la secuenciación del ADN. En algunas realizaciones, la etapa de analizar el ADN comprende además la identificación de la frecuencia con que aparece cada pareja de clase VH y VL en la muestra. 35

En algunos aspectos de la descripción, se presenta una colección antes de someter a ensayo/escrutar utilizando la presentación en fagos, en levaduras, ribosómica, bacteriana o eucariota. En algunas realizaciones, una colección se presenta en células procariontas o eucariotas. En algunas realizaciones, una colección se presenta en formato Fab o IgG o en otro formato conocido por un experto en la técnica. 40

El escrutinio se puede realizar mediante el uso de uno de los métodos bien conocidos en la técnica, tal como presentación en fagos, fago infeccioso de forma selectiva, tecnología de polisomas para escrutar la unión y sistemas de ensayo para estudiar la actividad enzimática o la estabilidad de proteínas. Muchos métodos de este tipo son conocidos por el experto en la técnica y se proporcionan referencias a modo de ejemplo como las siguientes: Valle RP, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2003 Mar; 6(2):197-203; Ackermann BL Expert Rev. Proteomics. 2007 Abr; 4(2):175-86; y Anderson KS J Proteome Res. 2005 Jul-Ago; 4(4):1123-33. 45

En una realización de la presente descripción, los ensayos de escrutinio se llevan a cabo de tal manera que la unión del ligando con el anticuerpo produce una señal detectable, ya sea directa o indirectamente. Tales señales incluyen, por ejemplo, la producción de un complejo, la formación de un producto de reacción catalítico, la liberación o la absorción de energía y similares. Las células de una población sometida a transformación con un ADN recombinante objeto, se pueden clonar para producir colonias monoclonales, por ejemplo. Las células que forman estas colonias se pueden recoger, lisar y examinar su contenido en ADN para estudiar la presencia del ADN recombinante usando un método conocido en la técnica, por ejemplo, tal y como se describe en Southern, J. Mol. Biol., 98:503 (1975) o Berent et al., Biotech. 3:208 (1985). 50 55

Propiedades biofísicas

La invención incluye colecciones de acuerdo con las reivindicaciones, y métodos para preparar tales colecciones, en

donde las parejas de clase VH/VL tienen propiedades biofísicas deseables. Las propiedades biofísicas favorables y deseadas incluyen una mayor estabilidad, niveles de expresión más elevados y una tendencia reducida a la agregación.

5 Las propiedades biofísicas adecuadas facilitan el uso de la colección en diferentes etapas. Por ejemplo, el escrutinio de la colección se facilita si anticuerpos o fragmentos de los mismos son solubles y no se agregan, y se expresan bien en el ruido de fondo del escrutinio, tal como fago. Un desarrollo posterior de un anticuerpo, como para ensayos con animales y usos terapéuticos, se ve facilitado por propiedades tales como la solubilidad del anticuerpo, termoestabilidad, niveles elevados de expresión (especialmente como IgG en células de mamífero), e inmunogenicidad reducida.

10 Para asegurar que todos, o al menos la mayoría, de los anticuerpos o fragmentos de los mismos, tienen tales propiedades biofísicas favorables, las parejas de clase VH/VL se pueden escrutar por adelantado para identificar qué parejas de clase muestran qué propiedades. A continuación se construye la genoteca mediante la síntesis de ácidos nucleicos que codifican solo los anticuerpos con tales propiedades biofísicas favorables.

15 Por supuesto, no todas las parejas de clase VH/VL mostrarán todas las propiedades biofísicas en el mismo grado, y una persona con conocimientos ordinarios en la técnica determinará qué propiedades son más relevantes y/o el equilibrio de cada propiedad, antes de determinar qué parejas de clase VH/VL se tienen que sintetizar.

20 Por lo tanto, en ciertos aspectos, la presente invención proporciona una genoteca de anticuerpos sintéticos, seleccionada para que combinaciones de VH/VL se presenten de manera eficaz, como en la superficie de un fago, o con otras tecnologías de presentación. Preferiblemente todas las combinaciones de VH/VL, esencialmente todas o sustancialmente todas, se presentan de manera eficaz. La eficacia de la presentación se puede medir mediante el ELISA de tipo sándwich en fagos, tal y como se describe en la presente invención.

25 En otros aspectos, la presente invención proporciona una genoteca de anticuerpos sintéticos seleccionada para combinaciones de VH-VL que están expresados de forma adecuada en *E. coli* en formato Fab. Preferiblemente todas las combinaciones de VH/VL, esencialmente todas o sustancialmente todas se expresan de forma adecuada en *E. coli* en formato Fab. La expresión en formato Fab en *E. coli* se puede cuantificar y es preferiblemente superior a 2 mg/L, superior a 5 mg/L, superior a 10 mg/L o superior a 15 mg/L en un cultivo bacteriano. En ciertos aspectos, todas las VH-VL se expresan con más de 2 mg/L, esencialmente todas las combinaciones de VH-VL se expresan a niveles superiores a 5 mg/L, la mayoría de las combinaciones de VH-VL se expresan a niveles superiores a 10 mg/L en un cultivo bacteriano, y/o al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco combinaciones de VH-VL se expresan a niveles superiores a 15 mg/L en un cultivo bacteriano.

30 En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una genoteca de anticuerpos sintéticos seleccionada para combinaciones de VH-VL expresadas de forma adecuada en un sistema de mamífero en formato IgG. La gran mayoría de los productos biológicos terapéuticos basados en anticuerpos que están actualmente en el mercado, están en formato IgG por una serie de razones: (i) la semivida de las moléculas de IgG en el cuerpo humano es muy alta (alrededor de 3 semanas) debido a la interacción de la IgG con el receptor neonatal (FcRn); (ii) las moléculas de IgG son muy solubles, termodinámicamente estables y relativamente resistentes a las proteasas en la sangre; e (iii) IgG posee actividad ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y/o CDC (citotoxicidad dependiente del complemento), que se requiere para la eliminación de células tumorales. La expresión de una combinación particular de VH/VL en formato Fab no se correlaciona necesariamente con la expresión de la misma combinación de VL/VH en formato IgG, y así la expresión y la solubilidad de las combinaciones de VL/VH en formatos IgG también son importantes factores independientes.

35 El sistema de mamífero puede incluir, por ejemplo, un cultivo en suspensión de mamífero, un cultivo de células adherentes de mamífero, células HKB11, células PERC.6 o células CHO. Preferiblemente todas las combinaciones de VH/VL, esencialmente todas o sustancialmente todas se expresan bien en un sistema de mamífero en formato IgG. En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a una genoteca de anticuerpos humanos sintéticos en donde todas las combinaciones de VH-VL se expresan a niveles superiores a 10 mg/L en un sistema de mamífero en formato IgG en el que esencialmente todas las combinaciones de VH-VL se expresan a niveles superiores a 15 mg/L en un sistema de mamífero en formato IgG; en donde la mayoría de las combinaciones de VH-VL se expresan a niveles superiores a 20 mg/L en un sistema de mamífero en formato IgG; y/o al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco combinaciones de VH-VL se expresan a niveles superiores a 25 mg/L en un sistema de mamífero en formato IgG.

40 En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a una genoteca de anticuerpos sintéticos seleccionada para combinaciones de VH/VL que son térmicamente estables. Preferiblemente todas las combinaciones, esencialmente todas o sustancialmente todas son térmicamente estables con una T_m de al menos 68, 70, 72, 74 o 76°C. La estabilidad térmica se puede medir tal y como se describe en el presente documento. En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a una genoteca de anticuerpos humanos sintéticos en donde esencialmente todas las combinaciones de VH-VL tienen una T_m de más de 68°C; esencialmente todas las combinaciones de VH-VL tienen una T_m de más de 70°C o de más de 72°C; la mayoría de las combinaciones de VH-VL tienen una T_m de más de 74°C; y o muchas combinaciones de VH-VL tienen una T_m de más de 76°C. En ciertos aspectos, al menos tres, al menos

cuatro o al menos cinco combinaciones de VH-VL tienen una T_m de más de 70°C.

5 En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a una genoteca de anticuerpos sintéticos seleccionada para combinaciones de VH-VL que son solubles, es decir, no tienden a agregarse. La solubilidad se puede determinar, por ejemplo, mediante un plegamiento y características de expresión favorables de un Fab sometido a ensayo en un hospedador bacteriano o IgG1 en un hospedador eucariota o la agregación después de la purificación, tal como se determina por cromatografía analítica de exclusión por tamaño.

10 La baja inmunogenicidad se puede predecir o someter a ensayo directamente por métodos conocidos en la técnica, pero también puede deducirse por el hecho de que las parejas de clase VH/VL proporcionadas son las más abundantes en el repertorio y las secuencias de proteínas utilizadas son sustancialmente secuencias de proteínas de la línea germinal.

15 Tal y como se describe en el presente documento, los datos de la secuencia de anticuerpos se pueden obtener a partir de linfocitos B, por ejemplo, linfocitos B no activados, bases de datos disponibles públicamente y/o la bibliografía. Cada una de las secuencias de anticuerpos se puede alinear con la familia y/o el gen de la línea germinal más cercano. A partir de estos datos, se pueden determinar las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL y/o las parejas de clase VH/VL que son abundantes.

20 Una vez que se determinan las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL y/o las parejas de clase VH/VL que son abundantes, se puede seleccionar qué familia y/o genes de VH y VL de la línea germinal y/o parejas de clase VH/VL se van a someter a ensayo para analizar propiedades biofísicas favorables. Una metodología sería clasificar las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL de acuerdo con la abundancia y después someter a ensayo las familias y/o los genes de la línea germinal de VH y VL que son más abundantes, por ejemplo, las 20 familias y/o genes de la línea germinal de VH y VL principales más abundantes. Además, se pueden combinar las 20 familias y/o genes de la línea germinal de VH y VL principales más abundantes, dando como resultado, por ejemplo, 400 combinaciones de VH y VLs y someterlas a ensayo para estudiar propiedades biofísicas favorables. Además, o de manera complementaria, se pueden someter a ensayo las parejas de clase VH/VL que son más abundantes para estudiar propiedades biofísicas favorables.

25 Las propiedades biofísicas favorables incluyen, pero no se limitan a: (i) se presentan de forma adecuada en fagos en el formato Fab, (ii) se presentan de forma adecuada en células de mamífero en el formato IgG, (iii) se expresan en grandes cantidades en formato Fab, por ejemplo, en *E. coli*, y en formatos IgG, por ejemplo, en células de mamífero, (iv) son termodinámicamente estables; (v) tienen una estabilidad elevada en suero, (vi) tienen poca tendencia a la agregación (es decir, solubilidad elevada); y (vii) tienen un bajo riesgo de inmunogenicidad.

30 En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a una colección de ácidos nucleicos sintéticos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprende parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 0,5% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En algunas realizaciones, las parejas de clase VH y VL están presentes en una concentración de al menos 1% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En algunas realizaciones, las parejas de clase VH y VL están presentes en una concentración de al menos 2% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En algunas realizaciones, los linfocitos B se aíslan a partir de un hospedador humano. En algunas realizaciones, los linfocitos B no están activados. En algunos aspectos, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden regiones estructurales de la línea germinal de VH y VL. En algunas realizaciones la colección comprende al menos 1×10^4 secuencias de ácido nucleico, al menos 1×10^5 secuencias de ácido nucleico; al menos 1×10^6 secuencias de ácido nucleico, al menos 1×10^{10} secuencias de ácido nucleico o al menos 1×10^{11} secuencias de ácido nucleico.

35 En algún aspecto, la presente descripción se refiere a un kit que comprende datos de secuencias que ilustran ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden ácidos nucleicos presentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B humanos no activados, en donde dichos datos de secuencias están en un soporte legible. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a la colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de fragmentos funcionales de los mismos. En algunas realizaciones, el vector es un vector de presentación en fagos. En algunas realizaciones, el vector es un vector fagémido. En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a células hospedadoras transformadas con los vectores de la colección que comprende la colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de fragmentos funcionales de los mismos. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son procariotas. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son *E. coli*. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son eucariotas. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son de mamífero.

50 En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a un método para producir una colección de ácidos nucleicos sintéticos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos, que comprende: la síntesis de una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 0,5 % de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B. En algunas realizaciones, los linfocitos B se aíslan a partir de un hospedador humano. En algunas realizaciones, los linfocitos B no están activados. En algunas realizaciones, las parejas de clase

VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B, se identifican por un método que comprende

- aa) recoger linfocitos B no activados a partir de uno o varios hospedadores humanos;
- ab) aislar el ADN de los linfocitos B recogidos en la etapa aa); y
- ac) analizar el ADN aislado en la etapa ab).

5 En algunas realizaciones, la etapa de analizar el ADN comprende la secuenciación del ADN. En algunas realizaciones, la etapa de analizar el ADN comprende además la identificación de la frecuencia con que aparece cada pareja de clase VH y VL en la muestra. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la inserción de ácidos nucleicos en una colección de vectores. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En algunas realizaciones, el vector es un vector de presentación. En algunas realizaciones, el vector de presentación es un vector fagémido. En algunas realizaciones, el método comprende además transfectar dichos vectores en una célula hospedadora adecuada. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es procariota. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es *E. coli*. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es eucariota. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es de mamífero.

10 En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a un método para identificar un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos del mismo, específicos de un inmunógeno, que comprende las etapas de: a) sintetizar una colección de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprende parejas de clase VH y VL presentes en una concentración de al menos 0,5% de las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B; b) escrutar la colección en busca de un inmunógeno específico; y c) seleccionar uno o varios anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos de dicho inmunógeno. En algunas realizaciones, los linfocitos B se aíslan a partir de un hospedador humano. En algunas realizaciones, los linfocitos B no están activados. En algunas realizaciones, las parejas de clase VH y VL existentes en una muestra de al menos 1×10^5 linfocitos B se identifican por un método que comprende

- aa) recoger linfocitos B no activados a partir de uno o varios hospedadores humanos;
- ab) aislar el ADN a partir de los linfocitos B recogidos en la etapa aa); y
- ac) analizar el ADN aislado en la etapa ab).

15 En algunas realizaciones, la etapa de analizar el ADN comprende la secuenciación del ADN. En algunas realizaciones, la etapa de analizar el ADN comprende además la identificación de la frecuencia con que aparece cada pareja de clase VH y VL en la muestra. En algunas realizaciones, la etapa de síntesis de la colección comprende además insertar dichos ácidos nucleicos en una colección de vectores. En algunas realizaciones, el método comprende además transfectar dichos vectores en una célula hospedadora adecuada. En algunas realizaciones, el método comprende además presentar dicha colección.

Ejemplos

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

20 En un aspecto, la presente descripción describe colecciones de anticuerpos que comprenden regiones estructurales que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal, específicamente FR1. Se espera que tener secuencias de la línea germinal reduzca el riesgo de inmunogenicidad de los anticuerpos, cuando se administran en seres humanos. Los sitios de restricción compatibles, sin embargo, se deben utilizar con el fin de permitir una clonación estándar de los ácidos nucleicos que codifican las colecciones de anticuerpos en vectores de presentación y/o expresión, de modo que los anticuerpos se puedan escrutar en busca de inmunógenos. En el pasado, los sitios de restricción utilizados para la clonación se encontraban frecuentemente dentro de las regiones estructurales, modificando de este modo la secuencia de ácido nucleico y/o de aminoácidos, alejándola de la línea germinal. Con el fin de garantizar que al menos la región estructural 1 (FR1) de cada uno de los anticuerpos de la presente descripción conserva una secuencia de proteínas de la línea germinal, no debería haber ningún sitio de restricción de origen no natural dentro de FR1. Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción es la incorporación de un sitio de restricción idéntico o al menos compatible en el extremo C-terminal de secuencias señal procariotas y una secuencia líder humana, específicamente dentro de los tres residuos C-terminales. Además, la secuencia señal y la secuencia líder que comprenden un sitio de restricción idéntico o compatible, deben ser funcionales y permitir una buena presentación y niveles de expresión de los anticuerpos o fragmentos de los mismos en ambos sistemas de expresión, procariota y de mamífero.

Ejemplo 1.1: Análisis de residuos de aminoácidos abundantes en el extremo C-terminal de secuencias señal de *E. coli*

A continuación se describe la selección de sitios de restricción que se van a incorporar en el extremo C-terminal de una secuencia señal, ompA y phoA de *E. coli*, y la evaluación de la funcionalidad de las secuencias señal resultan-

tes.

Como primera etapa, se analizaron los residuos de aminoácidos comunes en los tres aminoácidos C-terminales de secuencias señal (-3 a -1) y se generó una secuencia de consenso, como se muestra en la Tabla 1. Véase Chou et al., Prediction of protein signal sequences, Protein Pept. Sci. 3(6):615-22 (diciembre de 2002).

5 Tabla 1: Secuencias de consenso de los tres aminoácidos C-terminales de las secuencias señal

-3	-2	-1
A	L	A
S	A	G
V	S	S
T	Q	

En la posición -3, se observaron predominantemente los aminoácidos A, S, V y T. En la posición -2, se observaron predominantemente los aminoácidos L, A, S y Q. En la posición -1, se observaron predominantemente A, G y S.

Ejemplo 1.2: Selección de un sitio de restricción para la secuencia señal de E. coli de la cadena pesada (phoA)

10 Después de comparar las secuencias de consenso mostradas en la Tabla 1 para sitios de restricción conocidos, se seleccionaron los tres sitios de restricción siguientes: AflII, NheI y AvrII y para la incorporación en el extremo C-terminal de phoA y, posteriormente, se estudiaron los niveles de expresión. Es importante tener en cuenta que al cambiar las secuencias de nucleótidos de tipo silvestre a secuencias de nucleótidos modificados, también cambian las secuencias de aminoácidos. Las secuencias de ácidos nucleicos de los sitios de restricción seleccionados y las
15 secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2:

AflII	V	L	S
	GTC	TTA	AGY
NheI	V	L	A
	GTG	CTA	GCN
AvrII	V	L	G
	GTC	CTA	GGN

20 Como testigo, en la secuencia señal phoA de tipo silvestre se estudiaron los niveles de expresión. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la secuencia señal phoA de tipo silvestre, incluyendo las 3 secuencias C-terminales, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3:

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

M K Q S T I A L A L L P L L F T P V T K A						
ATGAAACAGAGCACCATTGCCCTGGCCCTGCTGCCGCTGCTGTTTACCCAGTGACCAAAGCC						
Extremo C-terminal de phoA de tipo silvestre						
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%; text-align: center;">T</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">K</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">A</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">ACC</td> <td style="text-align: center;">AAA</td> <td style="text-align: center;">GCC</td> </tr> </table>	T	K	A	ACC	AAA	GCC
T	K	A				
ACC	AAA	GCC				

25 Con el fin de evaluar los niveles de expresión, los sitios de restricción mostrados en la Tabla 2 se incorporaron en la secuencia señal phoA, modificando también de ese modo la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre. Las secuencias señal resultantes se utilizaron para expresar fragmentos Fab que comprendían o bien a) las secuencias de proteínas de la línea germinal VH3-23 o b) VH1-69. Estos genes de la línea germinal fueron seleccionados ya que se sabe que son estables y se expresan bien. En ambas secuencias de genes de la línea germinal VH3-23 y VH1-69,
30 se incorporó la CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) del anticuerpo 4D5, y la secuencia del gen de la línea germinal JH4 se utilizó para FR4. El anticuerpo 4D5 se describe en PDB entrada 1 FVC; Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D. Wong, W. L. et al. (1992); Humanization Biophysical Properties of Human Antibody Domains 551 of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289. Se genera-

ron plásmidos basados en pMORPHX11 (que se muestran en la Fig. 50) que comprendían a) secuencias señal *phoA* que comprendían los sitios de restricción C-terminales y secuencias de aminoácidos de la Tabla 2, b) las secuencias VH de VH3-23 y VH1-69, incorporando la CDR-H3 y JH4, como se ha descrito anteriormente, y c) la cadena ligera estable y que se expresa de forma adecuada procedente de MOR03207. Todos los genes se generaron en Geneart (Regensburg, Alemania).

La expresión y el transporte periplásmico se comprobaron realizando un ELISA anti-Fd después de una extracción periplásmica. Los resultados del ELISA para la expresión de anti-Fd después de la extracción periplásmica, usando tampón BBS, se muestran en la Fig. 1. Como se muestra, en el grupo de VH3-23, las secuencias señal que incluían los sitios de restricción C-terminales, AfIII (VLS), NheI (VLA) y AvrII (VLG), conservaban niveles de expresión en el intervalo del tipo silvestre (TKA), teniendo mejores rendimientos con NheI (VLA) que con el tipo silvestre (TKA).

Además, la expresión de Fab en *E. coli* se efectuó después de un cultivo durante una noche en matraces de agitación y los niveles de producción de Fab se determinaron después de la purificación de Fab mediante cromatografía de afinidad e intercambio de tampón. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4:

Expresión de Fab empleando secuencias señal que incluyen los sitios de restricción C-terminales AfIII (VLS), NheI (VLA) y AvrII (VLG), en comparación con el tipo silvestre (TKA)

Estructura artificial de Fab	Tasa de expresión (mg/L)
VH3-23 TKA	11,0
VH3-23 VLS	2,0
VH3-23 VLA	11,0
VH3-23 VLG	9,0
VH1-69 TKA	7,5
VH1-69 VLS	5,0
VH1-69 VLA	2,5
VH1-69 VLG	3,5

Como se muestra, las secuencias señal que incluye los sitios de restricción C-terminales AfIII (VLS), NheI (VLA) y AvrII (VLG), en comparación con el tipo silvestre (TKA), expresan cantidades similares de Fab.

Basándose en los datos anteriores, se seleccionó el sitio de restricción NheI (VLA) para su incorporación en las secuencias señal de la cadena pesada (*phoA*). Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la secuencia señal *phoA* modificada con NheI (VLA) se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Secuencia señal *phoA* de *E. coli* modificada con VLA C-terminal y sitio de restricción para NheI (= GCTAGC):

M K Q S T I A L A L L P L L F T P V V L A
 ATGAAACAGAGCACCATTTGCCCTGGCCCTGCTGCCGCTGCTGTTTACCCAGTGGT**GCTAGCC**

Ejemplo 1.3: Selección de un sitio de restricción para la secuencia señal de *E. coli* de la cadena ligera kappa y lambda (*ompA*):

Un método similar al descrito en los Ejemplos 1.2 se utilizó para la selección de los sitios de restricción que se iban a incorporar en los extremos C-terminales de las secuencias señal de la cadena ligera (*ompA*) tanto para kappa como lambda.

Después de comparar las secuencias de consenso mostradas en la Tabla 1 para sitios de restricción conocidos, se seleccionaron los siguientes sitios de restricción: NdeI (AYG), NdeI (AYA) y BsiWI (TYA) para la incorporación en el extremo C-terminal de *ompA*, modificando de este modo también las secuencias de aminoácidos, y posteriormente se estudiaron para analizar los niveles de expresión. Las secuencias de los sitios de restricción seleccionados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6:

NdeI A Y G
 GCA TAT GGN
 NdeI A Y A

GCA TAT GCN

BsiWI T Y A

ACG TAC GCN

5 Como testigo, se estudió la secuencia señal ompA de tipo silvestre para analizar los niveles de expresión. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la secuencia señal ompA de tipo silvestre, incluyendo las 3 secuencias C-terminales, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7:

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

M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q A
 ATGAAAAAACCGCCATTGCCATTGCCGTGGCCCTGGCAGGCTTTGCCACCGTGGCGCAGGCC
 Extremo C-terminal de ompA de tipo silvestre A Q A
 GCG CAG GCC

10 Con el fin de evaluar los niveles de expresión, los sitios de restricción mostrados en la Tabla 6 se incorporaron en las secuencias señal ompA. Las secuencias señal modificadas resultantes se utilizaron para expresar fragmentos Fab que comprendían a) las secuencias de genes de la línea germinal de Kappa1 012 (IGKV1-39), b) Kappa3 L6 (IGKV3-11) o c) Lambda1 V1-13 (IGLV1-40). Estos genes de la línea germinal fueron seleccionados ya que se sabe que son estables y se expresan bien. En a) Kappa1 012 (IGKV1-39) y b) Kappa3 L6 (IGKV3-11), la región CDR-L3: QQHYTTPPT (para kappa) fue incorporada, en c) Lambda1 V1-13 (IGLV1-40) la región CDR-L3: QSYDSSLGCVV (para lambda) fue incorporada, y en a)-c), se empleó la secuencia del gen de la línea germinal de Jk1 como FR4 para la cadena ligera kappa; y la secuencia del gen de la línea germinal de JI2/3 se utilizó como FR4 para la cadena ligera lambda. Los plásmidos pMORPHX11 (mostrados en la Fig. 50) se generaron comprendiendo a) secuencias señal ompA que comprendían los sitios de restricción C-terminales de la Tabla 6, b) las secuencias de la línea germinal de VL de Kappa1 012 (IGKV1-39), b) Kappa3 L6 (IGKV3-11) o c) Lambda1 V1-13 (IGLV1-40), que incorporaban la CDR-L3 y FR4, como se ha descrito anteriormente, y c) la estructura artificial IGHVH3-23 TKA, como cadena pesada, descrita en el Ejemplo 1.2. Todos los genes se generaron en Geneart (Regensburg, Alemania).

15 La expresión y el transporte periplásmico se verificaron realizando una producción durante la noche de Fab en *E. coli*, una extracción periplásmica y ELISA anti-Fd después de la extracción periplásmica. Los resultados del ELISA para la expresión anti-Fd después de la extracción periplásmica usando tampón BBS, se muestran en la Fig. 2. Como se muestra, la secuencia señal que incluía NdeI (AYA) muestra una expresión tan buena o mejor que la de tipo silvestre (AQA).

25 Además, la expresión de Fab en *E. coli* se realizó después de un cultivo durante una noche en matraces de agitación y los niveles de producción de Fab se determinaron después de la purificación de Fab mediante cromatografía de afinidad e intercambio de tampón. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8:

Expresión de Fab empleando secuencias señal que incluyen los sitios de restricción C-terminales NdeI (AYA) en comparación con el tipo silvestre (AQA).

Estructura artificial	Tasa de expresión (mg/L)
VK1-39 AQA	8,5
VK1-39 AYA	5,5
VK3-11 AQA	7,0
VK3-11 AYA	9,5
VL1-40 AQA	5,0
VL1-40 AYA	5,0

30 Basándose en los datos anteriores, se seleccionó el sitio de restricción NdeI (AYA) para su incorporación en las secuencias señal de kappa y lambda (ompA). Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la secuencia señal ompA modificada con NdeI (AYA), se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

35

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

M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Y A
 ATGAAAAAACCGCCATTGCCATTGCCGTGGCCCTGGCAGGCTTTGCCACCGTGG**CATATG**CC

Ejemplo 1.4: Evaluación de la eficacia de la presentación de fragmentos Fab mediante secuencias señal en presentación en fagos

5 Tal como se han descrito en los Ejemplos 1.2 y 1.3, se seleccionaron los siguientes sitios de restricción para la incorporación en los extremos C-terminales de las secuencias señal de Fab y las secuencias líder de IgG:

Regiones variables de la cadena pesada (phoA y líder de la cadena pesada): NheI (VLA)

Regiones variables de la cadena ligera (κ y λ) (ompA y líder de kappa): NdeI (AYA)

La Fig. 3 muestra los sitios de restricción seleccionados y las secuencias de aminoácidos correspondientes.

10 Con el fin de mostrar que estas secuencias señal modificadas median en el transporte eficaz y la producción de fragmentos Fab, se generaron estructuras artificiales de vectores incorporando las secuencias señal seleccionadas en vectores de presentación tricistrónicos, que codificaban una VH, VL y pIII (proteína pIII de la cubierta del fago utilizada para la presentación en fagos). Esto se hizo con el fin de confirmar que tales vectores, que comprenden las secuencias señal seleccionadas, eran capaces de proporcionar tasas útiles de presentación en fagos. Se generaron estructuras artificiales tricistrónicas del vector pJPd1 (que se muestra en la Fig. 48) que comprendían la VH de genes de la línea germinal de VH3-23 o VH1-69, o la VL de genes de la línea germinal de VL1-40, VK1-39 o VK3-11, y los sitios de restricción de la cadena pesada seleccionada (phoA): NheI (VLA), y phoA de tipo silvestre (TKA) como testigo, o los sitios de restricción de la cadena ligera seleccionada (ompA): NdeI (AYA) y ompA de tipo silvestre (AQA), como testigo. Además, se generaron estructuras artificiales de vectores tricistrónicos pMORPH30 (se muestra en la Fig. 51) que comprendían lo mismo, como testigos. Las tasas de presentación relativa se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10:

Vector	Secuencia Señal	Tasa de Presentación Rel.	
		VCSM13	Hiperfago
pMORPH30	VH1-69_TKA VL1-40_AQA	0,6 / 0,7 / 0,9	0,7 / 1,0 / 1,6
pMORPH30	VH1-69_VLA VL1-40_AYA	0,4 / 0,2 / 0,4	0,7 / 0,4 / 0,7
pJPd1	VH1-69_TKA VL1-40_AQA	0,6 / 0,5 / 0,7	4,8 / 5,7 / 5,5
pJPd1	VH1-69_VLA VL1-40_AYA	0,6 / 0,4 / 0,7	3,2 / 2,9 / 2,9
pMORPH30	VH1-69_TKA Vk3-11_AQA	0,8	0,9
pMORPH30	VH1-69_VLA Vk3-11_AYA	0,1	0,4
pJPd1	VH1-69_TKA Vk3-11_AQA	0,3	1,8
pJPd1	JVH1-69_VLA Vk3-11_AYA	0,1	1,2
pMORPH30	VH1-69_TKA Vk1-39_AQA	<i>no realizado</i>	<i>no realizado</i>
pMORPH30	VH1-69_VLA Vk1-39_AYA	0,3	0,4
pJPd1	VH1-69_TKA Vk1-39_AQA	<i>no realizado</i>	<i>no realizado</i>
pJPd1	VH1-69_VLA Vk1-39_AYA	0,2	1,3
pMORPH30	VH3-23_TKA VL1-40_AQA	0,6	1,6
pMORPH30	VH3-23_VLA VL1-40_AYA	0,5	1,2
pJPd1	VH3-23_TKA VL1-40_AQA	0,5	7,3
pJPd1	VH3-23_VLA VL1-40_AYA	0,4	4,8
pMORPH30	VH3-23_TKA Vk1-39_AQA	<i>no realizado</i>	<i>no realizado</i>
pMORPH30	VH3-23_VLA Vk1-39_AYA	0,5	1,6
pJPd1	VH3-23_TKA Vk1-39_AQA	<i>no realizado</i>	<i>no realizado</i>

Vector	Secuencia Señal	Tasa de Presentación Rel.	
		VCSM13	Hiperfago
pJPd1	VH3-23_VLA Vk1-39_AYA	0,6	5,5
pMORPH30	VH3-23_TKA Vk3-11_AQA	0,7	2,0
pMORPH30	VH3-23_VLA Vk3-11_AYA	1,1	2,8
pJPd1	VH3-23_TKA Vk3-11_AQA	0,5	3,9
pJPd1	VH3-23_VLA Vk3-11_AYA	0,4	5,7

5 Como se muestra, los vectores pJPd1 que incorporaban las secuencias señal seleccionadas produjeron tasas de presentación relativa comparables a las de los vectores pMORPH30; y se detectaron tasas de presentación relativa superiores en comparación con los vectores pMORPH30, cuando se emplearon hiperfagos como fago auxiliar para la producción de fagos. Por lo tanto, los vectores pJPd1 que incluían las secuencias señal modificadas debían funcionar bien para la selección con presentación en fagos de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, contra antígenos diana.

10 Los Ejemplos 1.2-1.4 describen las herramientas necesarias para generar, expresar y presentar las colecciones de anticuerpos o de fragmentos funcionales de la presente descripción, ya que describen las secuencias señal y las secuencias líder que comprenden sitios de restricción, que permiten regiones FR1 con secuencias de proteínas de la línea germinal, y describen las cadenas principales de vectores útiles para la incorporación de las colecciones descritas de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos en un sistema de selección mediante presentación en fagos, o un sistema de expresión de mamífero para la identificación de anticuerpos contra cualquier inmunógeno. Por otra parte, las secuencias señal son portadoras de sitios de restricción que permiten una compatibilidad total con la presentación en fagos de Fab y plásmidos de expresión y plásmidos correspondientes de expresión de IgG.

15 Ejemplo 1.5: Ensayos de las secuencias líder de la cadena pesada humana y de kappa para estudiar la expresión de IgG que comprenden sitios de restricción C-terminales seleccionados

20 Con el fin de permitir un cambio sencillo entre los formatos de Fab expresado en *E. coli* y de IgG expresada en mamífero, se generaron las secuencias líder humanas para la cadena ligera de IgG (líder de kappa humana) y la cadena pesada de IgG (líder de la cadena pesada humana) para que contuvieran los mismos sitios de restricción que los extremos C-terminales de las secuencias señal ompA (NdeI (AYA)) y phoA (NheI (VLA)), modificando de este modo también algunas de las secuencias de los tres aminoácidos C-terminales.

25 La transferencia de la VH del plásmido de expresión de Fab basado en *E. coli*, dentro del vector de expresión de IgG de mamífero puede realizarse utilizando el sitio de restricción NheI descrito que se encuentra localizado (a) en el extremo C-terminal de la secuencia señal phoA, así como (b) en la posición correspondiente en el extremo C-terminal del líder de la cadena pesada humana. Con el fin de proporcionar esto, los tres aminoácidos finales de la secuencia señal phoA se modificaron (de TKA a VLA), y el extremo C-terminal del líder de la cadena pesada humana se adaptó, cambiando la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre (-3 a -1) de VLS a la de VLA compatible con phoA.

30 La transferencia de la VL del plásmido de expresión de Fab basado en *E. coli*, dentro del vector de expresión de IgG de mamífero se puede realizar utilizando el sitio de restricción NdeI descrito que se encuentra (a) en el extremo C-terminal de la secuencia señal ompA así como (b) en la posición correspondiente en el extremo C-terminal del líder de kappa humana. Con el fin de proporcionar esto, los tres aminoácidos finales de la secuencia señal ompA se modificaron (de AQA a AYA) y el extremo C-terminal del líder de kappa humana se adaptó, cambiando la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre (-3 a -1) de AYG a AYA compatible con ompA. Las secuencias de tipo silvestre y líder de la cadena pesada humana y líder de kappa humana, modificadas, se muestran en la Tabla 11.

ES 2 511 051 T3

Tabla 11

Líder de la cadena pesada

A)

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

M K H L W F F L L L V A A P R W V L S
 ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCC
 Extremo C-terminal V L S
 del líder de la ca-
 dena pesada de ti-
 po silvestre
 GTC CTG TCC

B)

Líder de la cadena pesada humana modificada con VLA C-terminal y sitio de restricción NheI (= GCTAGC):

M K H L W F F L L L V A A P R W V L A
 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCCGGTGGGTGCTAGCC

C)

Líder de kappa humana de tipo silvestre (la secuencia de aminoácidos C-terminal desde la posición -3 hasta -1 es AYG sin sitio de restricción):

M V L Q T Q V F I S L L L W I S G A Y G
 ATGGTGTTCAGACCCAGGTCTTCATTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG
 Extremo C-terminal del líder A Y G
 de kappa
 GCC TAC GGG

D)

Líder de kappa humana modificada con AYA C-terminal y sitio de restricción NdeI (= CATATG):

M V L Q T Q V F I S L L L W I S G A Y A
 ATGGTGTTCAGACCCAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCGCATATGCG

Con el fin de mostrar que estas secuencias señal/líder modificadas median en el transporte eficaz y la producción de proteína IgG1 humana, tanto el líder de la cadena pesada humana modificada y el líder de kappa humana modificada se clonaron en los plásmidos pJP_Ig (mostrados en las Figs. 52-54) para estudiar la expresión en mamíferos de IgG1 humana de longitud completa, en sustitución de las secuencias líder de tipo silvestre. Los vectores de expresión resultantes que contenían las secuencias líder modificadas, los genes de la región variable como se muestran en la Tabla 12 y las regiones constantes de las cadenas ligeras de kappa o lambda y las cadenas pesadas, se transfirieron en células HKB11 y la IgG1 humana se purificó a partir del material sobrenadante de cultivos celulares, varios días después de la transfección, mediante el uso de cromatografía con Proteína A. El contenido en IgG1 se determinó después de la purificación y el intercambio de tampón. Los rendimientos de la expresión se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

VH	VL	Expresión de IgG1 humana
>hVH_1_69*01	>hVL_3-1	36,4 mg/L
>hVH_1_69*01	>hVL_3-21	34,5 mg/L
>hVH_3_23	>hVL_3-1	40,0 mg/L
>hVH_3_23	>hVL_3-21	34,5 mg/L
>hVH_3_30	>hVK_3_20	25,6 mg/L

Todas las estructuras artificiales sometidas a ensayo expresan cantidades elevadas de IgG1 humana, lo que indica que las secuencias líder modificadas conservan los niveles de expresión. Las secuencias líder modificadas seleccionadas (a) dan como resultado rendimientos elevados de proteína IgG según el sistema de vector utilizado, (b) proporcionan una compatibilidad completa para el intercambio de formatos de anticuerpos, vectores y sistemas de expresión entre los sistemas procariontes y de mamífero y (c) se encuentran localizadas en las secuencias señal/líder conservando de este modo las secuencias completas de la línea germinal de FR1.

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

Un aspecto de la presente descripción es una colección o una genoteca de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos que comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes de la línea germinal más abundantes en el repertorio inmune humano, en donde cada anticuerpo o fragmentos funcionales del mismo, comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de la pareja de proteínas respectiva de la línea germinal, y en donde las parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas para su incorporación en la colección, comprenden propiedades biofísicas que aumentan la probabilidad de que cada uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, seleccionados a partir de la colección, se puedan desarrollar clínicamente y se puedan comercializar con éxito. Con el fin de generar una colección de este tipo, se tenían que evaluar muchos criterios. En general, se realizaron las siguientes etapas: se identificaron las parejas de genes predominantes de la línea germinal a partir del repertorio inmune humano; los ADNc de las parejas de genes predominantes de la línea germinal del repertorio inmune humano se sintetizaron y se clonaron en diversos fondos de vectores y se produjeron anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos; anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprendían las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de genes predominantes de la línea germinal se sometieron a ensayo funcionalmente para determinar sus propiedades biofísicas; y las propiedades biofísicas de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprendían las parejas de proteínas respectivas de la línea germinal se compararon; a continuación, un subconjunto de las parejas de proteínas de la línea germinal se seleccionaron para la incorporación en una colección. En algunas realizaciones, las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas actúan como entramados. En esas realizaciones, los entramados comprenden las secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal seleccionadas, en donde la VH y VL comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de la pareja respectiva en al menos FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3. En realizaciones específicas, CDR3 se puede diversificar. En realizaciones específicas, FR4 se fija, por ejemplo, para VH se puede utilizar la secuencia de JH4, para VL de kappa se puede utilizar la secuencia de Jk1, y para VL de lambda se puede utilizar la J12/3.

Ejemplo 2.1: Determinación de la utilización de genes de la línea germinal de parejas VH/VL

Con el fin de identificar las parejas de genes predominantes de la línea germinal de VH/VL del repertorio inmune humano, se analizaron datos disponibles públicamente y se tomaron muestras de linfocitos B humanos. Como primera etapa, los datos disponibles al público se revisaron para identificar artículos que describían las parejas de genes de la línea germinal de VH/VL aisladas a partir de linfocitos B. Como se ha mencionado, muchas bases de datos disponibles públicamente proporcionan secuencias de anticuerpos, sin embargo, muchas proporcionan solo las secuencias de un dominio variable, VH o VL, pero rara vez proporcionan la asociación de parejas de genes de la línea germinal VH/VL. Los siguientes artículos se identificaron y se analizaron con detalle: Wardemann H. et al. (2003) Science 301, 1374-1377 y cualquier tabla de apoyo; Yurasov S. et al. (2005) J. Exp. Med. 201, 703-712 y cualquier tabla de apoyo; Tsuiji M. et al. (2006) J. Exp. Med. 203, 393-401 y cualquier tabla de apoyo; Yurasov S. et al. (2006)

J. Exp. Med. 203, 2255-2262 y cualquier tabla de apoyo, Tiller T. et al. (2007) Immunity 26, 205-213 y cualquier tabla de apoyo, y Mietzner B. et al. (2008) PNAS 105, 9727-9732 y cualquier tabla de apoyo.

Las Figs. 4-9 muestran las parejas VH/VL de los linfocitos B aislados en Tsuiji M. et al. (2006).

Las Figs. 10-12 muestran las parejas VH/VL de los linfocitos B aisladas en Tiller T. et al. (2007).

5 Las Figs. 13-17 muestran las parejas VH/VL de los linfocitos B aisladas en Mietzner B. et al. (2008).

Las Figs. 18-20 muestran las parejas VH/VL de los linfocitos B aisladas en Wardemann H. et al. (2003).

Las Figs. 21 -23 muestran las parejas VH/VL de los linfocitos B aisladas en Yurasov S. et al. (2005).

Las Figs. 24-26 muestran las parejas VH/VL de los linfocitos B aisladas en Yurasov S. et al. (2006).

10 Datos adicionales de parejas VH/VL se identificaron a partir de una muestra de linfocitos B humanos, como se describe a continuación.

Ejemplo 2.2: Determinación de la utilización de parejas de genes VH/VL a partir de una muestra humana

15 Con el fin de obtener datos adicionales de la utilización de parejas de genes de la línea germinal VH/VL, se aislaron PBMCs a partir de un hospedador humano. Las PBMCs se clasificaron, los ADNc de los linfocitos B se amplificaron mediante PCR, el ADN de los linfocitos B se secuenció y luego las secuencias se lanzaron con IgBLAST (NCBI) para identificar las parejas de genes de la línea germinal VH/VL de cada linfocito B.

Ejemplo 2.2(a): Aislamiento y clasificación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs)

20 Los métodos generales para el aislamiento y la clasificación de las PBMCs humanas procedentes de sangre venosa y células mononucleares de la médula ósea, se describen en Tiller et al. JIM 2008. Las PBMCs se aislaron de la siguiente manera. Se recogieron 40 ml de sangre venosa a partir de un donante humano (7 días después de vacunación con Pandemrix® (vacuna de H1N1 de GlaxoSmithKline)) en tubos de recogida de sangre con 4x Li-heparina (Sarstedt) (10 ml cada uno). El contenido de cada Monovette se combinó en un solo tubo Falcon de 50 ml (total 40 ml) y después se añadieron 100 µl de RosetteSep (StemCell Technologies) (2,5 µl/ml), se mezcló bien en un rotor (5 rpm) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. La combinación de sangre/RosettaSep se diluyó con un volumen igual de 1 x PBS (Invitrogen). Se añadieron 15 ml de FicollPaque (GE Healthcare) a tubos cónicos nuevos de 50 ml y 20 ml de sangre diluida se superpuso sobre el FicollPaque, en total (4 tubos: cada uno con 15 ml de FicollPaque + 20 ml de sangre). Los tubos se centrifugaron en una centrífuga durante 30 min a 400 g (1400 rpm en una centrífuga de laboratorio Sigma) a temperatura ambiente sin frenado. Después de la centrifugación, las PBMCs enriquecidas formaron una banda en la interfase entre el plasma y el FicollPaque. Las PBMCs se retiraron de cada tubo con una pipeta y se transfirieron a un nuevo tubo de 50 ml. Las PBMCs se lavaron diluyendo hasta 40 ml con tampón FACS (PBS, 3% de FCS), y centrifugando en una centrífuga durante 10 minutos a 1250 rpm a 4°C. Las PBMCs se contaron con azul de tripano (10 µl de muestra + 90 µl de azul de tripano (diluido 1:10 con PBS)).

30 Las PBMCs se tiñeron mediante la resuspensión en ~5 ml de tampón FACS helado. Se prepararon partes alícuotas de células para la tinción. El fluoróforo se preparó para someterlo a ensayo. Las partes alícuotas se centrifugaron a 1250 rpm, 4°C y se retiró el sobrenadante. Los anticuerpos para la tinción se añadieron a los sedimentos celulares, según el esquema descrito en la Tabla 13.

35

Tabla 13:

	1	2	3	4	5	6	7
volumen	1,3 ml	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	1,3 ml	1,3 ml
n° de células [x 10e6]	2,7	0,3	0,3	0,3	0,3	2,7	2,7
CD19-APC		15 µl				15 µl	15 µl
CD27-FITC			30 µl			30 µl	30 µl
CD38-PE				15 µl		15 µl	
CD20-Biotina					2 µl	2 µl	
CD10-PE							15 µl
IgM-Biotina							2 µl
incubar 20 min a 4°C en oscuridad (aquí 30 min)							
lavar con 1 ml de tampón FACS, 1250 rpm, 4°C, 5 min, desechar el sobrenadante							
SA – PE-Cy7 (1:500)					100 µl (-1:1500)	200 µl (-1:5000)	200 µl (-1:5000)
incubar 20 min a 4°C en la oscuridad							
lavar dos veces con 1 ml de tampón FACS, 1250 rpm, 4°C, 5 min, desechar el sobrenadante							
resuspender el sedimento celular teñido en 500 µl de tampón FACS							

Las células se pasaron después a través de un filtro de células en tubos de FACS (Eppendorf) para evitar obstrucciones en el citómetro. Las células se colocaron sobre hielo, y se mantuvieron en la oscuridad.

5 Las células se clasificaron de forma aislada según el marcador de la superficie celular del fenotipo de interés. Por ejemplo, las células secretoras de anticuerpos eran CD19⁺CD20^{bajo}CD27^{alto}CD38^{alto} y los linfocitos B maduros sin activar eran CD19⁺CD27^{neg}CD10^{neg}IgM⁺. La presencia de los marcadores de la superficie celular se identificó utilizando anticuerpos de ratón anti-humanos (AbD: CD19, CD27, CD38, CD-20, y CD10) (Becton Dickinson: IgM). Las células se clasificaron frente a la dispersión lateral (puerta de células vivas con discriminación doble) en placas de PCR de 96 pocillos para células individuales (Eppendorf) que contenían 4 µl de 0,5 x PBS, DTT 10 mM, 8 U de ARNsin (Promega) utilizando un FACS Aria.

Las placas de PCR se prepararon como se muestra en la Tabla 14.

H ₂ O exenta de nucleasas	3200 µl
10xPBS	200 µl
DTT 0,1M	400 µl
RNAsin (40U/µl, Promega)	200 µl
total	4000 µl

15 Después de la clasificación, cada placa se selló inmediatamente con una lámina Microseal (BioRad) y se colocó sobre hielo seco. Una vez que la clasificación de células terminó, todas las placas se congelaron a -80°C.

Ejemplo 2.2(b): Amplificación con PCR de ADN de linfocitos B humanos

20 Las PBMCs se aislaron y se clasificaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.2(a). Transcritos de genes de Ig de los linfocitos B maduros sin activar (mn) clasificados de forma individual y las células secretoras de anticuerpos (asc) se amplificaron a continuación mediante PCR para determinar los emparejamientos de genes de la línea germinal VH/VL. Los métodos generales de PCR para amplificar el ADNc de los linfocitos B y los cebadores útiles para ello, se describen en Tiller et al. J Immunol Methods, 2008.

ES 2 511 051 T3

La estrategia general de PCR se muestra en la Fig. 27. Los cebadores específicos utilizados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15:

PCR para la cadena pesada μ o γ:		
1ª PCR para CP		
5' L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG	24
5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	23
5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAG	27
5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	24
3' C μ CH1 (mu)	GGGAATTCTCACAGGAGACGA	21
3' C γ CH1 (gamma)	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC	23
2ª PCR para CP		
5' AgeI VH1	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG	38
5' AgeI VH1/5	CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG	38
5' AgeI VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG	38
5' AgeI VH3-23	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG	38
5' AgeI VH4	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG	38
5' AgeI VH 4-34	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG	40
3' Sall JH 1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG	32
3' Sall JH 3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG	34
3' Sall JH 6	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG	33
3' IgG (interna)	GTTCGGGGAAGTAGTCCTTGAC	22
para PCR de la ligera kappa:		
1ª PCR para CL k		

ES 2 511 051 T3

5' L-Vk 1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG	25
5' L-Vk 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG	28
5' L-Vk 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG	25
3' Ck 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA	24
2ª PCR para CL k		
5' Pan Vk	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG	24
3' Ck 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT	22
para PCR de la cadena ligera lambda		
1ª PCR para CL λ		
5' L-VI 1	GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG	23
5' L-VI 2	GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG	23
5' L-VI 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG	23
5' L-VI 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG	23
5' L-VI 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG	23
5' L-VI 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG	23
5' L-VI 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	23
3'C(CACCAGTGTGGCCTTGTGGCTTG	24
2ª PCR para CL λ		
5'Agel VI 1	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG	38
5'Agel VI 2	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG	38
5'Agel VI 3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG	38
5'Agel VI 4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA	37

5'Agel VI 6	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG	38
5'Agel VI 7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG	38
3' XhoI CI	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG	28

Los ADNc de los linfocitos B maduros sin activar (mn) clasificados de forma individual y las células que secretaban anticuerpos (asc) se sintetizaron del modo siguiente. Primero se preparó la mezcla de RHP, RT y RT sobre hielo. La mezcla de RHP se preparó con lo siguiente: 115 µl de cebadores de hexámeros aleatorios (Roche) (300 ng/µl), 115 µl de NP-40 (Sigma) (10%), 35 µl de RNAsin y 542 µl de agua. La mezcla de RT se preparó con lo siguiente: 660 µl de 5x tampón RT, 110 µl de dNTP (Invitrogen) (cada uno 25 mM), 450 µl de agua, 220 µl de DTT 0,1 M, 44 µl de RNAsin (Promega), 55 µl de Superscript III (Transcriptasa inversa) (Invitrogen).

A continuación, se colocó una placa sobre hielos seco y se añadieron 3,5 µl de mezcla de RHP. La placa se cubrió con una lámina y se incubó a 68°C en un baño de agua durante 1 min. La placa se colocó a continuación sobre hielo normal. A continuación, se añadieron 7 µl de mezcla de RT y los pocillos se taparon con una lámina de papel de aluminio. El programa de amplificación RT se efectuó con las siguientes temperaturas y con las siguientes duraciones: 42°C durante 5', 25°C durante 10', 50°C durante 60', 94°C durante 5' y 4°C y se mantuvo. El ADNc se almacenó a -20°C.

La PCR anidada se realizó del modo siguiente. Transcritos de genes V de IgH, Igk e IgL humana se amplificaron con PCR de forma independiente. Se emplearon 3,5 µl de ADNc como molde. Todas las reacciones de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos, con un volumen total de 40 µl por pocillo. Para cada placa se prepararon 3 tubos de reacción, teniendo cada uno: 1154 µl de agua, 150 µl de tampón 10x, 16 µl de dNTPs, 5 µl de mezcla de cebadores 5', 5 µl de cebador 3' y 7 µl de HotStar Taq (Qiagen). Todas las reacciones de PCR anidada con cebadores específicos de los genes o mezclas de cebadores, se realizaron con 3,5 µl del primer producto de PCR sin purificar. Cada ronda de PCR se realizó tal y como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16:

Programa de PCR para la amplificación de transcritos del gen de Ig humana

Etapa	Temperatura	Duración
Activación de HotStar Taq	94 °C	15 min
Desnaturalización	94 °C	30 s
Reasociación	58 °C (IgH/Igk) 60 °C (IgL)	30 s
Elongación	72 °C	55 s (1ª PCR) 45 s (2ª PCR)
Elongación final	72 °C	10 min
Mantenimiento	4 °C	∞

} 50 ciclos

A continuación, partes alícuotas de 3 µl de las segundas PCRs se aplicaron sobre un gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio en tampón 1x TBE con una cantidad igual de tampón de carga durante 45 min a 150 V. Las bandas de ADN se visualizaron con luz UV. Los tamaños esperados de los productos de la PCR eran aproximadamente 450 pb para Igγ, 510 pb para Igk y 405 pb para Igλ.

Se combinaron 4 µl de productos de la PCR de VH, VK y VL (w/ que se emparejaban con el producto correspondiente VH o VL) con w/ 16 µl de ddH₂O en placas de 96 pocillos y se sometieron a Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemania para la secuenciación de las placas. Los cebadores de la secuenciación se proporcionaron a 10 pmol/µl (reserva de 50 pmol/µl, dilución 1:5) y se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17:

μHC:	5' Age VH-Mezcla
γHC:	3' IgG interna
VK:	5' Pan-VK
VL:	5' VL-Mezcla

Las secuencias resultantes se lanzaron con IgBLAST (NCBI) para identificar los genes de la línea germinal de VH, VK y VL, mostrados en las Figs. 28A-C (28-36).

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

Los datos de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL, identificadas a partir de la bibliografía disponible públicamente, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.1 y se muestra en las Figs. 4-26, se agruparon con los datos identificados a partir de una muestra humana, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.2 y se muestra en las Figs. 28-36.

10 Los datos agrupados se analizaron y se muestran como una clasificación en la Tabla 18, es decir, la clasificación de la concentración (%) de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificadas en el repertorio inmune humano.

Tabla 18: Frecuencia de la utilización de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL en el repertorio inmune humano

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.			
N= 2137			
Pos	V pesada	V ligera	%
1	IGHV3-23	IGKV1-5	1,26
2	IGHV4-34	IGKV3-20	1,17
3	IGHV3-23	IGKV3-20	1,12
4	IGHV4-39	IGKV3-15	1,03
5	IGHV3-23	IGKV3-15	0,94
6	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89
7	IGHV4-39	IGKV1-39/1D-39	0,84
	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,84
8	IGHV4-59	IGKV3-20	0,70
	IGHV1-18	IGKV3-20	0,70
9	IGHV3-30	IGKV3-20	0,66
	IGHV4-39	IGKV1-5	0,66

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-69	IGKV1-39/1D-39	0,66
	IGHV5-51	IGLV1-40	0,66
10	IGHV3-23	IGKV4-1	0,61
	IGHV4-39	IG KV3-20	0,61
	IGHV3-23	IGLV2-14	0,61
	IGHV4-39	IGLV3-21	0,61
11	IG HV3-23	IGKV1-39/1D-39	0,56
	IGHV3-30	IGKV1-39/1D-39	0,56
	IGHV3-30	IGKV3-11	0,56
	IGHV1-69	IGKV3-20	0,56
	IGHV3-48	IG KV3-20	0,56
	IGHV1-2	IGKV3-20	0,56
12	IGHV3-30	IGKV4-1	0,51
	IGHV5-51	IGLV2-14	0,51
13	IGHV4-59	IGKV4-1	0,47
	IGHV5-51	IGKV3-20	0,47
	IGHV3-7	IGKV1-39/1D-39	0,47
	IGHV3-7	IGKV1-5	0,47
	IGHV3-15	IGKV3-20	0,47
	IGHV4-39	IGLV2-14	0,47
	IGHV4-39	IGLV2-8	0,47
	IGHV4-34	IGLV2-14	0,47
14	IGHV3-23	IGKV3-11	0,42
	IGHV3-30	IGKV1-5	0,42

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

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

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-30	IGKV1-9	0,33
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,33
	IGHV5-51	IGKV1-39/1D-39	0,33
	IGHV5-51	IGKV3-15	0,33
	IGHV1-69	IGKV3-15	0,33
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,33
	IGHV3-48	IGKV3-11	0,33
	IGHV3-21	IGKV1-39/1D-39	0,33
	IGHV4-31	IGKV3-20	0,33
	IGHV4-31	IGKV3-11	0,33
	IGHV3-30	IGLV 2-14	0,33
	IGHV4-39	IGLV 1-44	0,33
	IGHV1-69	IGLV 1-40	0,33
	IGHV3-9	IGLV 2-23	0,33
17	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,28
	IGHV4-39	IGKV3-11	0,28
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,28
	IGHV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,28
	IGHV5-51	IGKV3-11	0,28
	IGHV5-51	IGKV1-13	0,28
	IGHV3-7	IGKV3-20	0,28
	IGHV3-48	IGKV3-15	0,28
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,28
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,28

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

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

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,23
	IGHV1-18	IGKV1-5	0,23
	IGHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,23
	IGHV3-21	IGKV3-20	0,23
	IGHV3-33	IGKV1-5	0,23
	IGHV3-53	IGKV1-39/1D-39	0,23
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,23
	IGHV3-11	IGKV1-39/1D-39	0,23
	IGHV3-11	IGKV3-15	0,23
	IGHV4-4	IGKV1-39/1 D-39	0,23
	IGHV1-46	IGKV1-39/1D-39	0,23
	IGHV4-61	IGKV4-1	0,23
	IG HV3-23	IGLV 1-44	0,23
	IGHV3-23	IGLV 2-11	0,23
	IGHV3-23	IGLV 3-1	0,23
	IGHV3-30	IGLV 1-40	0,23
	IGHV4-39	IGLV 1-51	0,23
	IGHV4-39	IGLV 2-23	0,23
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,23
	IGHV5-51	IGLV 1-44	0,23
	IGHV1-69	IGLV 1-51	0,23
	IGHV1-69	IGLV 2-11	0,23
	IGHV1-18	IGLV 2-14	0,23
	IGHV1-18	IGLV 1-40	0,23

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-21	IGLV 2-14	0,23
	IGHV1-2	IGLV 1-44	0,23
19	IGHV3-23	IGKV1-27	0,19
	IGHV3-23	IGKV1-8	0,19
	IGHV3-30	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV4-39	IGKV1-33/1D-33	0,19
	IGHV4-39	IGKV1-27	0,19
	IGHV4-59	IGKV3-11	0,19
	IGHV5-51	IGKV1-5	0,19
	IGHV5-51	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-7	IGKV3-11	0,19
	IGHV3-7	IGKV2-30	0,19
	IGHV1-18	IGKV3-15	0,19
	IGHV1-18	IGKV3-11	0,19
	IGHV3-21	IGKV4-1	0,19
	IGHV3-15	IGKV3-15	0,19
	IGHV3-15	IGKV4-1	0,19
	IGHV3-15	IGKV1-33/1D-33	0,19
	IGHV4-31	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV4-31	IGKV1-5	0,19
	IGHV4-31	IGKV3-15	0,19
	IGHV4-31	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-33	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,19

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-53	IGKV3-11	0,19
	IGHV3-74	IGKV3-20	0,19
	IGHV4-4	IGKV1-5	0,19
	IGHV1-46	IGKV1-9	0,19
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,19
	IGHV1-24	IGKV3-11	0,19
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV3-23	IGLV 2-23	0,19
	IGHV3-30	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV 2-14	0,19
	IGHV4-59	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV 1-51	0,19
	IGHV4-34	IGLV 2-8	0,19
	IGHV5-51	IGLV 1-47	0,19
	IGHV1-69	IGLV 2-8	0,19
	IGHV3-7	IGLV 1-40	0,19
	IGHV3-15	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-31	IGLV 2-23	0,19
	IGHV3-33	IGLV 2-14	0,19
	IGHV3-33	IGLV 1-47	0,19
	IGHV3-33	IGLV 2-23	0,19
	IGHV3-33	IGLV 3-21	0,19
	IGHV3-9	IGLV 1-44	0,19

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-4	IGLV 2-14	0,19
	IGHV1-46	IGLV 1-51	0,19
	IGHV4-61	IGLV 1-44	0,19
	IGHV1-8	IGLV 2-14	0,19
	IGHV4-28	IGLV 2-23	0,19
20	IGHV3-23	IGKV1-9	0,14
	IGHV3-23	IGKV1-16	0,14
	IGHV4-39	IGKV1-6	0,14
	IGHV4-59	IGKV1-5	0,14
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,14
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,14
	IGHV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-48	IGKV1-8	0,14
	IGHV3-15	IGKV3-11	0,14
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-15	IGKV1-9	0,14
	IGHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV1-2	IGKV1-5	0,14
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,14

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-11	IGKV3-20	0,14
	IGHV3-11	IGKV3-11	0,14
	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,14
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,14
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,14
	IGHV3-74	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-74	IGKV1-5	0,14
	IGHV3-74	IGKV3-15	0,14
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,14
	IGHV4-4	IGKV3-15	0,14
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,14
	IGHV4-4	IGKV3-11	0,14
	IGHV1-46	IGKV1-5	0,14
	IGHV1-46	IGKV3-15	0,14
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,14
	IGHV1-3	IGKV3-15	0,14
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,14
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,14
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,14
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,14

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-23	IGLV 1-51	0,14
	IGHV3-30	IGLV 3-21	0,14
	IGHV3-30	IGLV 3-1	0,14
	IGHV4-39	IGLV 1-47	0,14
	IGHV4-39	IGLV 2-18	0,14
	IGHV4-59	IGLV 1-47	0,14
	IGHV5-51	IGLV 2-23	0,14
	IGHV5-51	IGLV 3-21	0,14
	IGHV1-69	IGLV 2-23	0,14
	IGHV3-7	IGLV 1-44	0,14
	IGHV3-7	IGLV 1-51	0,14
	IGHV3-7	IGLV 1-47	0,14
	IGHV3-7	IGLV 3-21	0,14
	IGHV1-18	IGLV 1-44	0,14
	IGHV1-18	IGLV 1-51	0,14
	IGHV3-48	IGLV 3-1	0,14
	IGHV3-21	IGLV 1-47	0,14
	IGHV3-15	IGLV 7-46	0,14
	IGHV4-31	IGLV 1-40	0,14
	IGHV4-31	IGLV 1-51	0,14
	IGHV4-31	IGLV 1-47	0,14
	IGHV1-2	IGLV 1-51	0,14
	IGHV1-2	IGLV 2-23	0,14
	IGHV1-2	IGLV 3-1	0,14

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-11	IGLV 2-14	0,14
	IGHV3-11	IGLV 1-44	0,14
	IGHV3-11	IGLV 2-11	0,14
	IGHV3-11	IGLV 3-1	0,14
	IGHV3-9	IGLV 1-47	0,14
	IGHV3-9	IGLV 2-11	0,14
	IGHV3-74	IGLV 2-23	0,14
	IGHV3-74	IGLV 3-21	0,14
	IGHV4-4	IGLV 1-40	0,14
	IGHV1-46	IGLV 2-14	0,14
	IGHV1-46	IGLV 1-44	0,14
	IGHV4-61	IGLV 2-14	0,14
21	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV3-30	IGKV2-30	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-6	0,09
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,09
	IGHV3-30	IGKV1D-8	0,09
	IGHV4-39	IG KV2-30	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,09

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,09
	IGHV5-51	IGKV2-30	0,09
	IGHV1-69	IGKV1-27	0,09
	IGHV1-69	IGKV1-8	0,09
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-9	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-17	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-27	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-13	0,09
	IGHV1-18	IGKV4-1	0,09
	IGHV1-18	IGKV2-30	0,09
	IGHV3-48	IGKV1-9	0,09
	IGHV3-48	IGKV1-17	0,09
	IGHV3-48	IGKV1-16	0,09
	IGHV3-21	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-21	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV3-21	IGKV1-27	0,09
	IGHV3-21	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-21	IGKV1-6	0,09
	IGHV4-31	IGKV4-1	0,09
	IGHV4-31	IGKV1-17	0,09
	IGHV4-31	IGKV1-27	0,09

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-2	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-2	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV1-2	IGKV1-27	0,09
	IGHV3-33	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-33	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV3-33	IGKV1-9	0,09
	IGHV3-53	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-53	IGKV1-27	0,09
	IGHV3-53	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-11	IGKV4-1	0,09
	IGHV3-11	IGKV1-6	0,09
	IGHV3-9	IGKV3-15	0,09
	IGHV3-9	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-9	IGKV1-16	0,09
	IGHV3-74	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-74	IGKV2-30	0,09
	IGHV4-4	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV4-4	IGKV2D-29	0,09
	IGHV1-46	IGKV3-11	0,09
	IGHV1-46	IGKV1-27	0,09
	IGHV1-46	IGKV1-16	0,09
	IGHV4-61	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-8	IG KV3-20	0,09
	IGHV1-8	IGKV4-1	0,09

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-24	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV1-24	IGKV2-30	0,09
	IGHV1-3	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-49	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-49	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-43	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-64	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-64	IGKV3-11	0,09
	IGHV7-81	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-13	IGKV4-1	0,09
	IGHV3-72	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-72	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-58	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-66	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-23	IGLV 1-36	0,09
	IGHV3-30	IGLV 2-23	0,09
	IGHV3-30	IGLV 2-11	0,09
	IGHV3-30	IGLV 9-49	0,09
	IGHV3-30	IGLV 3-10	0,09
	IGHV4-39	IGLV 3-1	0,09
	IGHV4-39	IGLV 6-57	0,09
	IGHV4-59	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-59	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-59	IGLV 2-11	0,09

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-34	IGLV 1-44	0,09
	IGHV4-34	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-34	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-34	IGLV 3-25	0,09
	IGHV5-51	IGLV 1-36	0,09
	IGHV5-51	IGLV 3-25	0,09
	IGHV1-69	IGLV 1-47	0,09
	IGHV1-69	IGLV 3-21	0,09
	IGHV1-69	IGLV 3-1	0,09
	IGHV3-7	IGLV 2-14	0,09
	IGHV1-18	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-18	IGLV 6-57	0,09
	IGHV3-48	IGLV 2-11	0,09
	IGHV3-21	IGLV 1-40	0,09
	IGHV3-21	IGLV 1-44	0,09
	IGHV3-21	IGLV 3-21	0,09
	IGHV3-21	IGLV 2-11	0,09
	IGHV3-21	IGLV 4-69	0,09
	IGHV3-15	IGLV 1-40	0,09
	IGHV3-15	IGLV 1-51	0,09
	IGHV3-15	IGLV 3-1	0,09
	IGHV3-15	IGLV 2-8	0,09
	IGHV3-15	IGLV 7-43	0,09
	IGHV4-31	IGLV 3-21	0,09

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-2	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-2	IGLV 7-46	0,09
	IGHV3-33	IGLV 6-57	0,09
	IGHV3-53	IGLV 2-14	0,09
	IGHV3-11	IGLV 2-23	0,09
	IGHV3-11	IGLV 3-21	0,09
	IGHV3-11	IGLV 4-69	0,09
	IGHV3-9	IGLV 3-21	0,09
	IGHV3-9	IGLV 2-8	0,09
	IGHV3-74	IGLV 2-14	0,09
	IGHV4-4	IGLV 1-51	0,09
	IGHV4-4	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-4	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-46	IGLV 2-11	0,09
	IGHV4-61	IGLV 2-11	0,09
	IGHV1-8	IGLV 1-47	0,09
	IGHV1-24	IGLV 2-23	0,09
	IGHV1-3	IGLV 2-14	0,09
	IGHV1-3	IGLV 2-23	0,09
	IGHV1-3	IGLV 3-1	0,09
	IGHV3-49	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-44	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-51	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-36	0,09

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-43	IGLV 1-51	0,09
	IGHV3-64	IGLV 3-21	0,09
	IGHV7-81	IGLV 2-14	0,09
	IGHV7-81	IGLV 3-21	0,09
22	IGHV3-23	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-23	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-23	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-23	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-23	IGKV1D-13	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-30	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-30	IGKV5-2	0,05
	IGHV3-30	IGKV2D-30	0,05
	IGHV4-39	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-39	IGKV3D-15	0,05
	IGHV4-59	IGKV2-30	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-59	IGKV1D-43	0,05
	IGHV4-59	IGKV2D-30	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-12	0,05
	IGHV5-51	IGKV1-9	0,05
	IGHV5-51	IGKV1-17	0,05
	IGHV5-51	IGKV1-27	0,05
	IGHV5-51	IGKV1-12	0,05
	IGHV1-69	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-69	IGKV1-16	0,05
	IGHV1-69	IGKV1-6	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,05
	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,05
	IGHV3-7	IGKV1-6	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-17	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-16	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-12	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV3-48	IGKV1-5	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-48	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-48	IGKV1-6	0,05
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-15	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-15	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-15	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-15	IGKV1D-43	0,05
	IGHV4-31	IGKV1-6	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-29	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-2	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-6	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-33	IGKV2-24	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-53	IGKV1-9	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-53	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-53	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-29	0,05
	IGHV3-53	IGKV1D-16	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-11	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-9	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-9	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-8	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-9	IGKV1D-8	0,05
	IGHV4-4	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-4	IGKV1-27	0,05
	IGHV4-4	IGKV1-6	0,05
	IGHV4-4	IGKV1D-8	0,05
	IGHV1-46	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-46	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-46	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-61	IGKV3-11	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-61	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-9	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,05
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,05
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-24	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-6	0,05
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,05
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-28	IGKV3-20	0,05
	IGHV4-28	IGKV1-39/1 D-39	0,05
	IGHV3-43	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,05
	IGHV3-43	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-43	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-64	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-64	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-64	IGKV2D-29	0,05
	IGHV7-81	IGKV1-5	0,05
	IGHV7-81	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-81	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-33/1 D-33	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-13	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-72	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-73	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-73	IGKV1-9	0,05
	IGHV1-58	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-58	IGKV4-1	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-58	IGKV3-11	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-20	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV3-23	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-23	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-23	IGLV 7-43	0,05
	IGHV3-23	IGLV 2-18	0,05
	IGHV3-23	IGLV 3-19	0,05
	IGHV3-30	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-30	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-30	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-30	IGLV 3-27	0,05
	IGHV4-39	IGLV 7-46	0,05
	IGHV4-39	IGLV 3-9	0,05
	IGHV4-59	IGLV 2-8	0,05
	IGHV4-59	IGLV 6-57	0,05
	IGHV4-59	IGLV 3-12	0,05
	IGHV4-34	IGLV 2-11	0,05
	IGHV4-34	IGLV 1-36	0,05
	IGHV4-34	IGLV 7-43	0,05
	IGHV4-34	IGLV 9-49	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV5-51	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-69	IGLV 6-57	0,05
	IGHV1-69	IGLV 3-25	0,05
	IGHV1-69	IGLV 3-10	0,05
	IGHV3-7	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-7	IGLV 3-1	0,05
	IGHV3-7	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-7	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-7	IGLV 3-27	0,05
	IGHV1-18	IGLV 2-23	0,05
	IGHV1-18	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-18	IGLV 1-36	0,05
	IGHV1-18	IGLV 3-25	0,05
	IGHV1-18	IGLV 3-10	0,05
	IGHV3-48	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-48	IGLV 1-44	0,05
	IGHV3-48	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-48	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-48	IGLV 3-21	0,05
	IGHV3-48	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-48	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-48	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-21	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-21	IGLV 3-1	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-21	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-21	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-21	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-21	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-15	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-15	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-15	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-15	IGLV 3-21	0,05
	IGHV3-15	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-15	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-15	IGLV 2-18	0,05
	IGHV3-15	IGLV 3-22	0,05
	IGHV4-31	IGLV 1-44	0,05
	IGHV4-31	IGLV 2-11	0,05
	IGHV4-31	IGLV 3-1	0,05
	IGHV4-31	IGLV 4-69	0,05
	IGHV4-31	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-2	IGLV 3-21	0,05
	IGHV1-2	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-2	IGLV 3-27	0,05
	IGHV3-33	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-33	IGLV 1-44	0,05
	IGHV3-33	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-33	IGLV 2-11	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-33	IGLV 3-1	0,05
	IGHV3-33	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-33	IGLV 3-27	0,05
	IGHV3-33	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-33	IGLV 3-9	0,05
	IGHV3-53	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-53	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-53	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-53	IGLV 2-11	0,05
	IGHV3-53	IGLV 3-1	0,05
	IGHV3-53	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-53	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-11	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-11	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-11	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-11	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-11	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-11	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-11	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-11	IGLV 8-61	0,05
	IGHV3-9	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-9	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-9	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-9	IGLV 4-60	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-74	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-74	IGLV 2-11	0,05
	IGHV3-74	IGLV 3-1	0,05
	IGHV3-74	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-74	IGLV 7-43	0,05
	IGHV3-74	IGLV 7-46	0,05
	IGHV4-4	IGLV 2-11	0,05
	IGHV4-4	IGLV 3-1	0,05
	IGHV4-4	IGLV 3-25	0,05
	IGHV4-4	IGLV 9-49	0,05
	IGHV1-46	IGLV 1-40	0,05
	IGHV1-46	IGLV 1-47	0,05
	IGHV1-46	IGLV 2-23	0,05
	IGHV1-46	IGLV 3-21	0,05
	IGHV1-46	IGLV 6-57	0,05
	IGHV4-61	IGLV 2-23	0,05
	IGHV4-61	IGLV 3-21	0,05
	IGHV4-61	IGLV 3-1	0,05
	IGHV4-61	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-8	IGLV 1-51	0,05
	IGHV1-8	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-8	IGLV 2-8	0,05
	IGHV1-8	IGLV 9-49	0,05
	IGHV1-24	IGLV 2-14	0,05

ES 2 511 051 T3

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-24	IGLV 1-40	0,05
	IGHV1-24	IGLV 1-44	0,05
	IGHV1-24	IGLV 3-21	0,05
	IGHV1-24	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-3	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-49	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-8	0,05
	IGHV4-28	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV 2-11	0,05
	IGHV3-43	IGLV 3-1	0,05
	IGHV3-43	IGLV 1-36	0,05
	IGHV3-43	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-64	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-64	IGLV 7-43	0,05
	IGHV7-81	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-72	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-72	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-73	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-73	IGLV 1-51	0,05

Pos: representa la posición de la clasificación relativa de las parejas VH/VL determinadas por el porcentaje (%) de cada pareja VH/VL de la muestra total.

N= 2137

Pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-73	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-73	IGLV 2-11	0,05
	IGHV3-73	IGLV 6-57	0,05
	IGHV1-58	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-66	IGLV 1-44	0,05
	IGHV3-66	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-66	IGLV 3-25	0,05
	IGHV4-30.2	IGLV 3-21	0,05
	IGHV7-4.1	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-20	IGLV 2-14	0,05

Ejemplo 2.4 Utilización de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL en el repertorio inmune humano "no activado"

5 Adicionalmente, los datos agrupados que comprendían los datos de parejas de genes de la línea germinal VH/VL, identificados a partir de la bibliografía disponible al público, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.1 y se muestra en las Figs. 4-26 y los datos de parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificados a partir de una muestra humana tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.2 y se muestra en las Figs. 28-36, se analizaron para identificar la utilización de genes de la línea germinal en el repertorio inmune humano no activado. Es importante diferenciar entre las poblaciones de linfocitos B sin activar, sin experiencia con antígenos y las poblaciones con experiencia con antígenos. Los linfocitos B sin activar, sin experiencia con antígenos incluyen, pero sin limitación, linfocitos B inmaduros, nuevos linfocitos B que emigran y linfocitos B maduros sin activar, en donde las secuencias de anticuerpos son todavía de la línea germinal. Los linfocitos B con experiencia con antígenos incluyen, pero sin limitación, células secretoras de anticuerpos IgG, linfocitos B de memoria IgM e IgG, en donde la mayoría de los anticuerpos comprenden hipermutaciones somáticas.

15 Se cree que parejas de genes diferentes de la línea germinal están hiperrepresentadas entre las dos poblaciones de linfocitos B, los linfocitos B que no están activados, sin experiencia con antígenos, en comparación con las poblaciones de linfocitos B con experiencia con antígenos. Un aspecto de la presente descripción es generar una colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos, que se puede utilizar para identificar anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos contra cualquier inmunógeno, por lo tanto, puede ser preferible producir una colección que comprende las parejas de genes de la línea germinal VH/VL que se expresan de forma predominante en el repertorio inmune sin activar, sin experiencia con antígenos.

25 Con el fin de identificar las parejas de genes de la línea germinal VH/VL que se expresan en el repertorio inmune sin activar, sin experiencia con antígenos, los datos agrupados procedentes de la bibliografía disponible al público, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.1 y se muestran en las Figs. 4-26, y los datos de parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificados a partir de una muestra humana tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.2 y se muestra en las Figs. 28-36, se analizaron para distinguir las poblaciones de linfocitos B sin experiencia con antígenos de linfocitos B inmaduros, nuevos linfocitos B que emigran y linfocitos B maduros sin activar, de las poblaciones de linfocitos B con experiencia con antígenos. La clasificación de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL representativas del repertorio inmune humano sin activar se muestra en la Tabla 19.

30

ES 2 511 051 T3

Tabla 19

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
1	IGHV4-34	IGKV3-20	1,56
2	IGHV4-39	IGKV3-15	1,19
3	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,97
4	IGHV3-23	IGKV3-20	0,89
	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89
	IGHV1-69	IGKV1-39/1D-39	0,89
5	IGHV4-39	IGKV1-39/1D-39	0,82
	IGHV1-18	IGKV3-20	0,82
	IGHV5-51	IGLV1-40	0,82
6	IGHV4-39	IGKV3-20	0,74
	IGHV4-39	IGKV1-5	0,74
	IGHV4-59	IGKV3-20	0,74
7	IGHV3-23	IGKV1-5	0,67
	IGHV3-23	IGKV3-15	0,67
	IGHV3-30	IGKV1-39/1D-39	0,67
	IGHV3-30	IGKV3-11	0,67
	IGHV1-69	IGKV3-20	0,67
	IGHV4-39	IGLV 2-8	0,67
8	IGHV3-23	IGKV1-39/1D-39	0,59
	IGHV3-30	IGKV1-5	0,59
	IGHV3-7	IGKV1-39/1 D-39	0,59
	IGHV1-2	IGKV3-20	0,59
	IGHV4-59	IGLV 1-40	0,59
	IGHV4-34	IGLV 2-14	0,59

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
9	IGHV3-23	IGKV4-1	0,52
	IGHV5-51	IGKV3-20	0,52
	IGHV5-51	IGKV4-1	0,52
	IGHV3-53	IGKV1-5	0,52
	IGHV3-23	IGLV 2-14	0,52
	IGHV4-34	IGLV 1-51	0,52
	IGHV1-69	IGLV 2-14	0,52
	IGHV1-69	IGLV 1-40	0,52
10	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,45
	IGHV3-30	IGKV3-20	0,45
	IGHV3-30	IGKV4-1	0,45
	IGHV3-30	IGKV1-9	0,45
	IGHV4-59	IGKV4-1	0,45
	IGHV4-34	IGKV3-15	0,45
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,45
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,45
	IGHV3-48	IGKV3-20	0,45
	IGHV3-48	IGKV3-11	0,45
	IGHV3-21	IGKV1-39/1D-39	0,45
	IGHV3-21	IGKV3-15	0,45
	IGHV3-15	IGKV3-20	0,45
	IGHV3-15	IGKV1-39/1D-39	0,45
	IGHV3-30	IGLV2-14	0,45
	IGHV5-51	IGLV2-14	0,45
	IGHV3-21	IGLV 1-51	0,45

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-2	IGLV 2-14	0,45
11	IGHV3-23	IGKV2-28/2D-28	0,37
	IGHV3-30	IGKV3-15	0,37
	IGHV4-39	IGKV3-11	0,37
	IGHV1-69	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-18	IGKV1-39/1D-39	0,37
	IGHV1-18	IGKV1-5	0,37
	IGHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,37
	IGHV3-48	IGKV1-39/1D-39	0,37
	IGHV3-48	IGKV3-15	0,37
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,37
	IGHV3-21	IGKV1-5	0,37
	IGHV3-15	IGKV1-5	0,37
	IGHV4-31	IGKV3-11	0,37
	IGHV3-33	IGKV3-20	0,37
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,37
	IGHV3-23	IGLV 1-40	0,37
	IGHV3-30	IGLV 1-51	0,37
	IGHV4-39	IGLV 2-14	0,37
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,37
	IGHV1-18	IGLV 1-40	0,37
	IGHV3-48	IGLV 2-14	0,37
	IGHV4-31	IGLV 2-14	0,37
12	IGHV3-23	IGKV3-11	0,30
	IGHV3-23	IGKV1-17	0,30

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-23	IGKV1-27	0,30
	IGHV4-39	IGKV1-33/1D-33	0,30
	IGHV4-59	IGKV3-11	0,30
	IGHV4-34	IGKV1-5	0,30
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,30
	IG HV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,30
	IGHV5-51	IGKV3-15	0,30
	IGHV5-51	IGKV3-11	0,30
	IGHV5-51	IGKV2-28/2D-28	0,30
	IGHV1-69	IGKV1-5	0,30
	IGHV3-7	IGKV3-15	0,30
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,30
	IGHV3-21	IGKV3-20	0,30
	IGHV3-21	IGKV4-1	0,30
	IGHV3-15	IGKV3-15	0,30
	IGHV3-33	IGKV1-39/1D-39	0,30
	IGHV3-53	IGKV1-39/1D-39	0,30
	IGHV3-53	IGKV3-15	0,30
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,30
	IGHV3-11	IGKV1-39/1D-39	0,30
	IGHV4-4	IGKV3-20	0,30
	IGHV1-46	IGKV3-20	0,30
	IGHV1-46	IGKV1-39/1D-39	0,30
	IGHV3-23	IGLV3-21	0,30
	IGHV3-23	IGLV 3-1	0,30

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-39	IGLV 1-40	0,30
	IGHV4-39	IGLV 1-44	0,30
	IGHV4-39	IGLV 1-51	0,30
	IGHV4-59	IGLV 1-51	0,30
	IGHV4-34	IGLV 1-40	0,30
	IGHV4-34	IGLV 1-47	0,30
	IGHV4-34	IGLV 2-8	0,30
	IGHV5-51	IGLV 1-44	0,30
	IGHV1-69	IGLV 1-51	0,30
	IGHV1-69	IGLV 2-8	0,30
	IGHV3-9	IGLV 2-14	0,30
	IGHV3-9	IGLV 2-23	0,30
	IGHV4-4	IGLV 1-44	0,30
	IGHV4-61	IGLV 1-44	0,30
13	IGHV3-23	IGKV1-8	0,22
	IGHV3-30	IGKV2-28/2D-28	0,22
	IGHV4-39	IGKV4-1	0,22
	IGHV4-39	IGKV1-27	0,22
	IGHV5-51	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,22
	IGHV3-7	IGKV3-20	0,22
	IGHV3-7	IGKV3-11	0,22
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,22
	IGHV1-18	IGKV3-11	0,22
	IGHV3-48	IGKV1-8	0,22

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-15	IGKV3-11	0,22
	IGHV3-15	IGKV1-33/1D-33	0,22
	IGHV4-31	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-31	IGKV3-15	0,22
	IGHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,22
	IGHV1-2	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV1-2	IGKV1-5	0,22
	IGHV3-33	IGKV3-15	0,22
	IGHV3-33	IGKV4-1	0,22
	IGHV3-11	IGKV1-5	0,22
	IGHV3-11	IGKV3-15	0,22
	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-4	IGKV3-15	0,22
	IGHV4-4	IGKV3-11	0,22
	IGHV1-46	IGKV1-9	0,22
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-61	IGKV4-1	0,22
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,22
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,22
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,22
	IG HV3-23	IGLV 2-23	0,22
	IGHV3-23	IGLV 2-11	0,22
	IGHV4-39	IGLV 2-23	0,22

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-69	IGLV 2-23	0,22
	IGHV1-18	IGLV 2-14	0,22
	IGHV3-48	IGLV 3-1	0,22
	IGHV3-15	IGLV 1-44	0,22
	IGHV4-31	IGLV 1-40	0,22
	IGHV1-2	IGLV 1-40	0,22
	IGHV1-2	IGLV 3-1	0,22
	IGHV3-33	IGLV 2-14	0,22
	IGHV3-33	IGLV 1-47	0,22
	IGHV3-33	IGLV 3-21	0,22
	IGHV3-9	IGLV 1-44	0,22
	IGHV3-9	IGLV 1-47	0,22
	IGHV3-9	IGLV 2-11	0,22
	IGHV1-46	IGLV 1-44	0,22
	IGHV1-8	IGLV 2-14	0,22
14	IGHV3-23	IGKV1-16	0,15
	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,15
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,15
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV3-30	IGKV1D-8	0,15
	IGHV4-39	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV4-39	IGKV2-30	0,15
	IGHV4-39	IGKV1-6	0,15
	IGHV4-59	IGKV1-5	0,15
	IGHV4-59	IGKV3-15	0,15

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,15
	IGHV5-51	IGKV1-5	0,15
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV1-69	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-69	IGKV3-11	0,15
	IGHV1-69	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-9	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-17	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-13	0,15
	IGHV1-18	IGKV4-1	0,15
	IGHV1-18	IGKV2-30	0,15
	IGHV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-48	IGKV1-17	0,15
	IGHV3-21	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-21	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-15	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-15	IGKV1-9	0,15
	IGHV4-31	IGKV3-20	0,15

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-31	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV1-2	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,15
	IGHV1-2	IGKV1-27	0,15
	IGHV3-33	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-33	IGKV1-9	0,15
	IGHV3-53	IGKV3-20	0,15
	IGHV3-53	IGKV3-11	0,15
	IGHV3-53	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-11	IGKV3-20	0,15
	IGHV3-11	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-11	IGKV3-11	0,15
	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-11	IGKV1-6	0,15
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-9	IGKV1-16	0,15
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,15
	IGHV3-74	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-74	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,15
	IGHV4-4	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV4-4	IGKV1-5	0,15
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,15
	IGHV4-4	IGKV2D-29	0,15
	IGHV1-46	IGKV3-15	0,15

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-46	IGKV1-16	0,15
	IGHV4-61	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-24	IGKV3-11	0,15
	IGHV1-24	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-49	IGKV3-20	0,15
	IGHV3-64	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-64	IGKV3-11	0,15
	IGHV7-81	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-13	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-72	IGKV3-15	0,15
	IGHV3-30	IGLV 1-40	0,15
	IGHV3-30	IGLV 1-44	0,15
	IGHV3-30	IGLV 2-23	0,15
	IGHV3-30	IGLV 3-21	0,15
	IGHV3-30	IGLV 9-49	0,15
	IGHV4-39	IGLV 2-18	0,15
	IGHV4-59	IGLV 2-23	0,15
	IGHV4-59	IGLV 2-11	0,15
	IGHV4-34	IGLV 1-44	0,15
	IGHV4-34	IGLV 2-23	0,15
	IGHV4-34	IGLV 3-25	0,15
	IGHV5-51	IGLV 1-47	0,15
	IGHV5-51	IGLV 2-23	0,15

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV5-51	IGLV 3-21	0,15
	IGHV5-51	IGLV 1-36	0,15
	IGHV5-51	IGLV 3-25	0,15
	IGHV1-69	IGLV 1-44	0,15
	IGHV1-69	IGLV 2-11	0,15
	IGHV1-69	IGLV 3-1	0,15
	IGHV1-18	IGLV 1-44	0,15
	IGHV1-18	IGLV 2-8	0,15
	IGHV1-18	IGLV 6-57	0,15
	IGHV3-48	IGLV 1-47	0,15
	IGHV3-21	IGLV 2-14	0,15
	IGHV3-21	IGLV 1-47	0,15
	IGHV3-21	IGLV 2-11	0,15
	IGHV3-15	IGLV 7-46	0,15
	IGHV4-31	IGLV 1-51	0,15
	IGHV4-31	IGLV 1-47	0,15
	IGHV4-31	IGLV 2-23	0,15
	IGHV1-2	IGLV 1-44	0,15
	IGHV1-2	IGLV 1-51	0,15
	IGHV1-2	IGLV 2-23	0,15
	IGHV1-2	IGLV 2-8	0,15
	IGHV3-11	IGLV 3-21	0,15
	IGHV3-11	IGLV 3-1	0,15
	IGHV3-9	IGLV 3-21	0,15
	IGHV3-74	IGLV 3-21	0,15

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-4	IGLV 2-14	0,15
	IGHV4-4	IGLV 1-51	0,15
	IGHV1-46	IGLV 1-51	0,15
	IGHV4-61	IGLV 2-11	0,15
	IGHV1-24	IGLV 2-23	0,15
	IGHV1-3	IGLV 2-14	0,15
	IGHV1-3	IGLV 3-1	0,15
	IGHV4-28	IGLV 1-44	0,15
	IGHV4-28	IGLV 1-36	0,15
	IGHV3-43	IGLV 1-51	0,15
15	IGHV3-23	IGKV1-9	0,07
	IGHV3-23	IGKV2-30	0,07
	IGHV3-23	IGKV1-12	0,07
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,07
	IGHV3-23	IGKV3D-20	0,07
	IGHV3-23	IGKV1D-12	0,07
	IGHV3-30	IGKV2-30	0,07
	IGHV3-30	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-30	IGKV1-16	0,07
	IGHV3-30	IGKV1-6	0,07
	IGHV3-30	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,07
	IGHV3-30	IGKV2D-30	0,07
	IGHV4-39	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-59	IG KV2-30	0,07

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,07
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-12	0,07
	IGHV5-51	IGKV1-17	0,07
	IGHV5-51	IGKV1-27	0,07
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-69	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-69	IGKV1-16	0,07
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,07
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,07
	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,07
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,07
	IGHV3-7	IGKV2-30	0,07
	IGHV3-7	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-7	IGKV1D-8	0,07
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,07
	IGHV1-18	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,07

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-18	IGKV1-16	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-12	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,07
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-5	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-9	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-16	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-6	0,07
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,07
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,07
	IGHV3-21	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-21	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-15	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-15	IGKV1D-43	0,07
	IGHV4-31	IGKV1-5	0,07
	IGHV4-31	IGKV4-1	0,07
	IG HV4-31	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-31	IGKV1-27	0,07
	IG HV4-31	IGKV1-6	0,07
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,07
	IGHV1-2	IGKV2-28/2D-28	0,07

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-2	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-2	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-6	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-5	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,07
	IG HV3-53	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IG HV3-53	IGKV1-9	0,07
	IGHV3-53	IGKV1-17	0,07
	IGHV3-53	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-53	IGKV1-12	0,07
	IGHV3-53	IGKV2-29	0,07
	IGHV3-53	IGKV1D-16	0,07
	IGHV3-11	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV3-11	IGKV1-9	0,07
	IGHV3-11	IGKV1-17	0,07
	IGHV3-11	IGKV1D-8	0,07
	IGHV3-9	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,07
	IGHV3-9	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-9	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV3-9	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-9	IGKV1-8	0,07
	IGHV3-9	IGKV1D-8	0,07

ES 2 511 051 T3

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-74	IGKV3-20	0,07
	IGHV3-74	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-74	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-74	IGKV2-30	0,07
	IGHV4-4	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV4-4	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-4	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-4	IGKV1D-8	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-5	0,07
	IGHV1-46	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-61	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,07
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,07
	IGHV1-8	IGKV1-39/1D-39	0,07
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-8	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,07
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-8	IGKV1-9	0,07
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,07
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,07
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,07
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,07

N= 1345			
pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-24	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-24	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,07
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,07
	IGHV1-3	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-3	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-49	IGKV1-5	0,07
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,07
	IGHV3-43	IGKV3-11	0,07

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

Una revisión de las Tablas 18-19 de los Ejemplos 2.3-4, muestra que un pequeño número de genes de la línea germinal de VH, V κ y V λ son dominantes en el repertorio inmune humano y en el repertorio inmune humano sin activar, en comparación con el número total de genes de la línea germinal. Wildt et al. en 895-896 también han descrito este fenómeno. Wildt et al. también han descrito que los segmentos de genes de la cadena pesada y ligera que se expresan frecuentemente están apareados frecuentemente, y observaron que la mitad de los apareamientos de la muestra se correspondían con parejas de genes de la línea germinal VH/VL.

Adicionalmente, los datos agrupados se evaluaron para identificar los genes de la línea germinal de VH, V κ y V λ que se expresan mucho, independientemente en el repertorio inmune humano. Por lo tanto, los datos que comprendían las parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificadas a partir de la bibliografía disponible al público, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.1 y se muestran en las Figs. 4-26; las parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificadas a partir de una muestra humana, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.2 y se muestran en las Figs. 28-36, y referencias adicionales de la bibliografía, que incluían la expresión de genes de la línea germinal de VH y/o VL sin emparejar, (véase, Brezinschek H.P. et al. (1997) J. Clin. Invest. 99, 2488, Demaison C. et al. (1995) Immunogenetics 42, 342, y Foster S.J. et al. (1997) J. Clin. Invest. 99, 1614, ambos artículos que se incorporan como referencia en su totalidad) se agruparon y se clasificaron para determinar qué genes de la línea germinal de VH, V κ y V λ eran los más expresados en el repertorio inmune humano. La Tabla 20 muestra la clasificación de la prevalencia de los genes de la línea germinal de VH, V λ y V κ .

Tabla 20: Utilización de genes de la línea germinal no apareados de VH, V κ y V λ en el repertorio inmune humano

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

26	IGHV3-49	1,0	26	IGKV2D-30	0,2	26	IGLVB-61	0,1
27	IGHV3-43	0,6	27	IGKV3D-11	0,2	27	IGLV3-16	0,0
28	IGHV4-28	0,6	28	IGKV3D-15	0,2	28	IGLV4-3	0,0
29	IGHV3-64	0,5	29	IGKV2-29	0,2	29	IGLV5-37	0,0
30	IGHV7-81	0,5	30	IGKV1D-16	0,1	30	IGLV5-39	0,0
31	IGHV3-13	0,4	31	IGKV1D-17	0,1	31	IGLV5-45	0,0
32	IGHV3-72	0,4	32	IGKV3D-7	0,1	32	IGLV5-52	0,0
33	IGHV1-58	0,3	33	IGKV6-21/6D-21	0,1	33	IGLV10-54	0,0
34	IGHV3-73	0,3	34	IGKV6D-41	0,1			
35	IGHV3-66	0,2	35	IGKV1D-13	0,0			
37	IGHV2-5	0,1						
38	IGHV4-30.2	0,1						
39	IGHV3-20	0,1						
40	IGHV6-1	0,0						
41	IGHV1-e	0,0						
42	IGHV1-f	0,0						
43	IGHV1-45	0,0						
44	IGHV2-26	0,0						
45	IGHV2-70	0,0						
46	IGHV3-d	0,0						
47	IGHV4-b	0,0						
48	IGHV4-30.4	0,0						
49	IGHV5-a	0,0						

5 Al comparar la Tabla 20 que muestra la prevalencia de los genes de la línea germinal de VH, Vλ y Vκ sin enlazar y las Tablas 18-19 que muestran la prevalencia de los genes de la línea germinal de VH, Vλ y Vκ enlazados dentro del repertorio inmune humano y el repertorio inmune humano sin activar, era evidente que muchos de los genes de la línea germinal de VH, Vλ y Vκ que estaban altamente representados cuando se evaluaban de forma independiente del enlazamiento o emparejamiento, también estaban altamente representados cuando se evaluaban en los emparejamientos VH/VL.

Esta observación se confirmó a través de los diagramas que se muestran en las Figs. 39-40, que muestran las pare-

jas de genes de la línea germinal VH/VL del repertorio inmune humano y las Figs. 41-42 que muestran las parejas de genes de la línea germinal VH/VL del repertorio inmune humano sin activar. Las Figs. muestran el número real de cada pareja de genes de la línea germinal VH/VL identificado a partir de los datos agrupados, representados en una matriz, en donde el eje Y incluye la clasificación de los genes de la línea germinal de VH y el eje X incluye la clasificación de los genes de la línea germinal de VL.

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

Como siguiente etapa, había que determinar qué pareja de proteínas de la línea germinal se iba a someter a ensayo, ya que existen ~2500 parejas en el repertorio inmune humano y los inventores pretendían identificar cuáles de las parejas de proteínas de la línea germinal comprenden propiedades biofísicas favorables que podrían ayudar en la selección y el desarrollo. Una vía podría ser someter a ensayo las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que aparecen de forma más destacada en el repertorio inmune humano, por ejemplo, véase la Tabla 18. Se podrían seleccionar, por ejemplo, las cuatrocientas parejas mejores para someter a ensayo o seleccionar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable expresadas por encima de una cierta concentración umbral. Esta metodología requeriría la síntesis y el análisis de un gran número de secuencias de parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable; por lo tanto, una metodología de este tipo puede que no fuera muy eficaz.

Como metodología alternativa, los inventores seleccionaron un subgrupo de las parejas de la línea germinal de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que son representativas, reproducen con exactitud o incluyen la mayoría de las parejas expresadas de forma destacada procedentes del repertorio inmune humano. Esta metodología se basaba en parte en la observación anterior de que un pequeño número de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable es dominante en el repertorio inmune humano. Por lo tanto, un pequeño número de los genes de la línea germinal de la cadena pesada y ligera expresados de forma destacada (sin emparejar) se puede combinar para generar un grupo de parejas que son representativas del repertorio inmune humano.

Esta metodología se asumió del modo siguiente. En el Ejemplo 3, se determinó la expresión de los genes de la línea germinal de la cadena pesada variable, la cadena ligera κ variable y la cadena ligera λ variable. Como siguiente etapa, se completó un análisis *in silico* de los genes más destacados de la línea germinal de VH, V λ y V κ , en donde al menos se evaluaron los siguientes factores: longitud de la CDR, punto isoeléctrico (pI) (el punto isoeléctrico preferido es de 7,5 o superior ya que tiene que proporcionar estabilidad en un tampón de formulación estándar desde pH 5,5 a pH 7), modificaciones postraduccionales (PTM's) (específicamente, sitios de glicosilación ligados a N (N \times S o N \times T) o modificaciones químicas tales como la escisión de Asp (frecuentemente en un DP), la isomerización de Asp (DD, DG), la desamidación (NS, NG) que puede tener lugar *in vivo* (en el suero) o después del almacenamiento en tampón de formulación y conduce a la pérdida de la unión del anticuerpo), la presencia de metioninas en las CDRs (pueden estar oxidadas cuando se exponen a disolvente), la presencia de cisteínas desemparejadas (formarán enlaces disulfuro con cualquier otra cisteína desemparejada conduciendo por tanto a un entrecruzamiento de proteínas y/o a niveles de expresión menores), desviaciones de la línea germinal, la presencia de posibles epítopos de linfocitos T y una propensión teórica a la agregación. Los datos seleccionados a partir del ensayo *in silico* se muestran en las Figs. 37-38.

Basándose en el análisis *in silico* de los genes de la línea germinal más destacados de VH, V λ y V κ , un subgrupo de éstos se seleccionó para la síntesis, combinación y análisis funcional posterior, este subgrupo se muestra en las Figs. 37-38. Tal y como se muestra, no todos los genes más destacados de la línea germinal de VH, V λ y V κ se seleccionaron para un análisis adicional. De los genes de la línea germinal de VH más destacados, tal y como se muestra en la Tabla 20, IGHV4-34, IGHV4-59 e IGHV3-9 no se seleccionaron. En su lugar, tal y como se muestra en las Fig. 37-38 y la Tabla 21, se seleccionaron IGHV3-74, IGHV3-73 e IGHV6-1. En total, se seleccionaron en total 20 genes de la línea germinal de VH. De los genes más destacados de la línea germinal de V κ , tal y como se muestra en la Tabla 20, IGKV4-1, IGKV2-28/2D-28, IGKV1-33/1 D-33 e IGKV1-8 no se seleccionaron. En total, se seleccionaron 12 genes de la línea germinal de V κ . De los genes más destacados de la línea germinal de VH, tal y como se muestra en la Tabla 20, IGLV1-44 no se seleccionó. En total, se seleccionaron 8 genes de la línea germinal de V λ .

La Tabla 21 muestra de nuevo la clasificación de la utilización de los genes de la línea germinal de VH, V κ y V λ procedentes del repertorio inmune humano y se marcan con negrita y se subrayan los genes de la línea germinal que se seleccionaron para un análisis funcional adicional.

Tabla 21 Clasificación de la prevalencia de genes de la línea germinal de VH, V λ y V κ a partir de datos disponibles públicamente y una muestra de linfocitos B humanos e identificación de los genes de la línea germinal de VH, V λ y V κ que se seleccionaron para ensayos funcionales adicionales que están **en negrita y subrayados**

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

26	IGHV3-49	1,0	26	IGKV2D-30	0,2	26	IGLV8-61	0,1
27	IGHV3-43	0,6	27	IGKV3D-11	0,2	27	IGLV3-16	0,0
28	IGHV4-28	0,6	28	IGKV3D-15	0,2	28	IGLV4-3	0,0
29	IGHV3-64	0,5	29	IGKV2-29	0,2	29	IGLV5-37	0,0
30	IGHV7-81	0,5	30	IGKV1D-16	0,1	30	IGLV5-39	0,0
31	IGHV3-13	0,4	31	IGKV1D-17	0,1	31	IGLV5-45	0,0
32	IGHV3-72	0,4	32	IGKV3D-7	0,1	32	IGLV5-52	0,0
33	IGHV1-58	0,3	33	IGKV6-21/6D-21	0,1	33	IGLV10-54	0,0
34	IGHV3-73	0,3	34	IGKV6D-41	0,1			
35	IGHV3-66	0,2	35	IGKV1D-13	0,0			
36	IGHV7-4.1	0,2						
37	IGHV2-5	0,1						
38	IGHV4-30.2	0,1						
39	IGHV3-20	0,1						
40	IGHV6-1	0,0						
41	IGHV1-e	0,0						
42	IGHV1-f	0,0						
43	IGHV1-45	0,0						
44	IGHV2-26	0,0						
45	IGHV2-70	0,0						
46	IGHV3-d	0,0						
47	IGHV4-b	0,0						
48	IGHV4-30.4	0,0						
49	IGHV5-a	0,0						

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

5 Tal y como se ha expuesto anteriormente y se muestra en la Tabla 21 y las Figs. 39-40, 41-42, los 20 de VH, 12 de Vκ y 8 de Vλ seleccionados, cuando se combinaban de forma adecuada reproducen o incluyen la mayoría de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL que se expresan de forma destacada procedente del repertorio inmune

humano y del repertorio inmune humano sin activar.

5 Como siguiente etapa, los genes de la línea germinal de VH, Vκ y Vλ seleccionados entre 20 de VH, 12 de Vκ y 8 de Vλ, se sintetizaron y se combinaron para generar 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL que reproducen o incluyen correctamente la mayoría de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL que se expresan de forma destacada en el repertorio inmune humano. Las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL se sometieron a ensayo a continuación para estudiar sus propiedades biofísicas.

La Tabla 22 muestra los genes de la línea germinal de VH, Vκ y Vλ seleccionados para combinarlos con el fin de generar las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL.

Tabla 22

VH	Vκ	Vλ
1. IGHV3-23	1. IGKV3-20	1. IGLV2-14
2. IGHV3-30	2. IGKV1-39/1D-39	2. IGLV1-40
3. IGHV4-39	3. IGKV1-5	3. IGLV1-51
4. IGHV1-69	4. IGKV3-15	4. IGLV2-23
5. IGHV5-51	5. IGKV3-11	5. IGLV3-21
6. IGHV3-7	6. IGKV2-30	6. IGLV1-47
7. IGHV1-18	7. IGKV1-9	7. IGLV3-1
8. IGHV3-48	8. IGKV1-17	8. IGLV2-11
9. IGHV3-15	9. IGKV1-27	
10. IGHV3-21	10. IGKV1-16	
11. IGHV1-2	11. IGKV1-6	
12. IGHV3-33	12. IGKV1-12	
13. IGHV4-31		
14. IGHV3-53		
15. IGHV3-11		
16. IGHV4-4		
17. IGHV1-46		
18. IGHV3-74		
19. IGHV3-73		
20. IGHV6-1		

10 Para mostrar que las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL generadas para someterlas a un ensayo funcional, reproducían de hecho correctamente o incluían la mayoría de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL expresadas de forma destacada en el repertorio inmune humano, la Tabla 18 se reproduce a continuación como Tabla 23, en donde las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL que se sometieron a ensayo están en **negrita y subrayadas**.

ES 2 511 051 T3

Tabla 23: Las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL que se sometieron a un ensayo funcional son representativas de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificadas en el repertorio inmune humano

pos	V pesada	V ligera	%
<u>1</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>1,26</u>
2	IGHV4-34	IGKV3-20	1,17
<u>3</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>1,12</u>
<u>4</u>	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>1,03</u>
<u>5</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,94</u>
6	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89
<u>7</u>	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,84</u>
	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,84
8	IGHV4-59	IGKV3-20	0,70
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,70</u>
<u>9</u>	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,66</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,66</u>
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,66</u>
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,66</u>
10	IGHV3-23	IGKV4-1	0,61
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,61</u>
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,61</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 3-21</u>	<u>0,61</u>
<u>11</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,56</u>
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,56</u>
12	IGHV3-30	IGKV4-1	0,51

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,51</u>
13	IGHV4-59	IGKV4-1	0,47
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,47</u>
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,47</u>
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,47</u>
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,47</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,47</u>
	IGHV4-39	IGLV 2-8	0,47
	IGHV4-34	IGLV2-14	0,47
<u>14</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,42</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,42</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,42</u>
	IGHV4-34	IGKV1-5	0,42
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,42</u>
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,42</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 1-51</u>	<u>0,42</u>
	IGHV4-34	IGLV1-51	0,42
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 1-51</u>	<u>0,42</u>
	IGHV3-53	IGLV 1-44	0,42
15	IGHV4-59	IGKV3-15	0,37
	IGHV4-34	IGKV3-15	0,37
	IGHV5-51	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-69	IGKV4-1	0,37
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,37</u>

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,37</u>
	IGHV4-59	IGLV1-40	0,37
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,37</u>
	IGHV1-69	IGLV1-44	0,37
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,37</u>
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,37</u>
16	IGHV3-23	IGKV2-28/2D-28	0,33
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-9</u>	<u>0,33</u>
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,33
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,33</u>
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,33
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,33</u>
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,33</u>
	IGHV4-39	IGLV1-44	0,33
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,33</u>
	IGHV3-9	IGLV 2-23	0,33
17	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,28
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,28</u>
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,28

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,28
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,28</u>
	IGHV5-51	IGKV1-13	0,28
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,28</u>
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,28
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,28
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,28</u>
	IGHV3-33	IGKV4-1	0,28
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-23</u>	IGLV 1-40	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-23</u>	IGLV 3-21	<u>0,28</u>
	<u>IGHV4-39</u>	IGLV1-40	<u>0,28</u>
	IGHV4-34	IGLV1-40	0,28
	IGHV4-34	IGLV1-47	0,28
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 1-47</u>	<u>0,28</u>
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,28</u>
	IGHV3-9	IGLV2-14	0,28

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-4	IGLV1-44	0,28
<u>18</u>	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-17</u>	<u>0,23</u>
	IGHV4-39	IGKV4-1	0,23
	IGHV4-39	IGKV2-28/2D-28	0,23
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,23</u>
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,23
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,23</u>
	IGHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,23
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,23</u>
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,23
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,23</u>
	IGHV4-61	IGKV4-1	0,23
	IGHV3-23	IGLV1-44	0,23
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 2-11</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 3-1</u>	<u>0,23</u>
	<u>IG HV3-30</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 1-51</u>	<u>0,23</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 2-23</u>	<u>0,23</u>
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,23
	IGHV5-51	IGLV 1-44	0,23
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 1-51</u>	<u>0,23</u>

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,19
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,19</u>
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,19</u>
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,19</u>
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV1-9</u>	<u>0,19</u>
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,19
	IGHV1-24	IGKV3-11	0,19
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,19
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 2-23</u>	<u>0,19</u>
	IGHV3-30	IGLV1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV2-14	0,19
	IGHV4-59	IGLV1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV 1-51	0,19
	IGHV4-34	IGLV2-8	0,19
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 1-47</u>	<u>0,19</u>
	IGHV1-69	IGLV 2-8	0,19
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 1-40</u>	<u>0,19</u>
	IGHV3-15	IGLV1-44	0,19
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 2-23</u>	<u>0,19</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,19</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 1-47</u>	<u>0,19</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 2-23</u>	<u>0,19</u>
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 3-21</u>	<u>0,19</u>
	IGHV3-9	IGLV1-44	0,19
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGLV 2-14</u>	<u>0,19</u>

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGLV 1-51</u>	<u>0,19</u>
	IGHV4-61	IGLV1-44	0,19
	IGHV1-8	IGLV2-14	0,19
	IGHV4-28	IGLV2-23	0,19
20	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-9</u>	<u>0,14</u>
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-16</u>	<u>0,14</u>
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-6</u>	<u>0,14</u>
	IGHV4-59	IGKV1-5	0,14
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,14
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,14
	IGHV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-48	IGKV1-8	0,14
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,14</u>
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,14
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-9</u>	<u>0,14</u>
	IGHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,14
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,14</u>
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,14
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV3-20</u>	<u>0,14</u>
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV3-11</u>	<u>0,14</u>
	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,14

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,14
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,14
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,14
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	<u>0,14</u>
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV1-5</u>	<u>0,14</u>
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,14</u>
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,14
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV3-15</u>	<u>0,14</u>
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,14
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,14
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,14
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,14
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,14
	IGHV1-3	IGKV3-15	0,14
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,14
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,14
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,14
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,14
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,14
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,14
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,14
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,14
	IGHV4-39	IGLV2-18	0,14

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-59	IGLV 1-47	0,14
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,14
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,14
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,14
	IGHV3-7	IGLV1-44	0,14
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,14
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,14
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,14
	IGHV1-18	IGLV 1-44	0,14
	IGHV1-18	IGLV1-51	0,14
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,14
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,14
	IGHV3-15	IGLV 7-46	0,14
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,14
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,14
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,14
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,14
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,14
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,14
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,14
	IGHV3-11	IGLV1-44	0,14
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,14
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,14
	IGHV3-9	IGLV1-47	0,14
	IGHV3-9	IGLV2-11	0,14
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,14

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,14
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,14
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,14
	IGHV1-46	IGLV 1-44	0,14
	IGHV4-61	IGLV 2-14	0,14
21	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,09
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-8	0,09
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,09
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,09
	IGHV3-30	IGKV1D-8	0,09
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,09
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,09
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,09
	IGHV1-69	IGKV1-8	0,09
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,09
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,09
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,09

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-66	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-23	IGLV 1-36	0,09
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,09
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,09
	IGHV3-30	IGLV 9-49	0,09
	IGHV3-30	IGLV 3-10	0,09
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,09
	IGHV4-39	IGLV 6-57	0,09
	IGHV4-59	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-59	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-59	IGLV 2-11	0,09
	IGHV4-34	IGLV 1-44	0,09
	IGHV4-34	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-34	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-34	IGLV 3-25	0,09
	IGHV5-51	IGLV 1-36	0,09
	IGHV5-51	IGLV 3-25	0,09
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,09
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,09
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,09
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,09
	IGHV1-18	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-18	IGLV 6-57	0,09
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,09
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,09
	IGHV3-21	IGLV 1-44	0,09

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,09
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,09
	IGHV3-21	IGLV 4-69	0,09
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,09
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,09
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,09
	IGHV3-15	IGLV 2-8	0,09
	IGHV3-15	IGLV 7-43	0,09
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,09
	IGHV1-2	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-2	IGLV 7-46	0,09
	IGHV3-33	IGLV 6-57	0,09
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,09
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,09
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,09
	IGHV3-11	IGLV 4-69	0,09
	IGHV3-9	IGLV3-21	0,09
	IGHV3-9	IGLV 2-8	0,09
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,09
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,09
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,09
	IGHV4-4	IGLV 2-8	0,09
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,09
	IGHV4-61	IGLV 2-11	0,09
	IGHV1-8	IGLV 1-47	0,09
	IGHV1-24	IGLV 2-23	0,09

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-59	IGKV1D-43	0,05
	IGHV4-59	IGKV2D-30	0,05
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-12	0,05
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,05
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,05
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,05
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-12</u>	0,05
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,05
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,05
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,05
	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,05
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,05
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,05
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,05
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-12</u>	0,05

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,05
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,05
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,05
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,05
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,05
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,05
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-15	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-15	IGKV1D-43	0,05
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-29	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-33/1D-33	0,05
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,05
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,05
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,05
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,05
	IGHV3-33	IGKV2-24	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-28/2D-28	0,05

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-9	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,05
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,05
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-24	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-6	0,05
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,05
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV4-28	IGKV3-20	0,05
	IGHV4-28	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV3-43	IGKV3-15	0,05

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,05
	IGHV3-43	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-43	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-64	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-64	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-64	IGKV2D-29	0,05
	IGHV7-81	IGKV1-5	0,05
	IGHV7-81	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-81	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-13	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-72	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-73	IGKV2-28/2D-28	0,05
	<u>IGHV3-73</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,05
	IGHV1-58	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-58	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-58	IGKV3-11	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-5	0,05

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-20	IGKV1-39/1D-39	0,05
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,05
	IGHV3-23	IGLV2-8	0,05
	IGHV3-23	IGLV 7-43	0,05
	IGHV3-23	IGLV2-18	0,05
	IGHV3-23	IGLV3-19	0,05
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,05
	IGHV3-30	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-30	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-30	IGLV3-27	0,05
	IGHV4-39	IGLV 7-46	0,05
	IGHV4-39	IGLV3-9	0,05
	IGHV4-59	IGLV2-8	0,05
	IGHV4-59	IGLV 6-57	0,05
	IGHV4-59	IGLV3-12	0,05
	IGHV4-34	IGLV2-11	0,05
	IGHV4-34	IGLV1-36	0,05
	IGHV4-34	IGLV 7-43	0,05
	IGHV4-34	IGLV 9-49	0,05
	IGHV5-51	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-69	IGLV 6-57	0,05
	IGHV1-69	IGLV 3-25	0,05
	IGHV1-69	IGLV 3-10	0,05
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,05
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,05
	IGHV3-7	IGLV 2-8	0,05

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-15	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-15	IGLV 2-18	0,05
	IGHV3-15	IGLV 3-22	0,05
	IGHV4-31	IGLV1-44	0,05
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,05
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,05
	IGHV4-31	IGLV 4-69	0,05
	IGHV4-31	IGLV 7-43	0,05
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,05
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,05
	IGHV1-2	IGLV 3-27	0,05
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,05
	IGHV3-33	IGLV 1-44	0,05
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,05
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,05
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,05
	IGHV3-33	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-33	IGLV 3-27	0,05
	IGHV3-33	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-33	IGLV 3-9	0,05
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,05
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,05
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,05
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,05
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,05
	IGHV3-53	IGLV 2-8	0,05

ES 2 511 051 T3

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

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,05
	IGHV1-46	IGLV 6-57	0,05
	IGHV4-61	IGLV 2-23	0,05
	IGHV4-61	IGLV 3-21	0,05
	IGHV4-61	IGLV 3-1	0,05
	IGHV4-61	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-8	IGLV 1-51	0,05
	IGHV1-8	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-8	IGLV 2-8	0,05
	IGHV1-8	IGLV 9-49	0,05
	IGHV1-24	IGLV 2-14	0,05
	IGHV1-24	IGLV 1-40	0,05
	IGHV1-24	IGLV 1-44	0,05
	IGHV1-24	IGLV 3-21	0,05
	IGHV1-24	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-3	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-49	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-8	0,05
	IGHV4-28	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV 2-11	0,05
	IGHV3-43	IGLV 3-1	0,05
	IGHV3-43	IGLV 1-36	0,05
	IGHV3-43	IGLV 9-49	0,05

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-64	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-64	IGLV 7-43	0,05
	IGHV7-81	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-72	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-72	IGLV 4-69	0,05
	<u>IGHV3-73</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,05
	<u>IGHV3-73</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,05
	<u>IGHV3-73</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,05
	<u>IGHV3-73</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,05
	IGHV3-73	IGLV 6-57	0,05
	IGHV1-58	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-66	IGLV 1-44	0,05
	IGHV3-66	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-66	IGLV 3-25	0,05
	IGHV4-30.2	IGLV 3-21	0,05
	IGHV7-4.1	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-20	IGLV 2-14	0,05

Ejemplo 4.2

5 Tal y como se ha expuesto en el Ejemplo 2.4, se encontró que era importante diferenciar entre las poblaciones de linfocitos B sin activar, sin experiencia con antígenos y las poblaciones con experiencia con antígenos. Por lo tanto, la Tabla 19 que muestra la clasificación de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificadas en el repertorio inmune humano sin activar, se reproduce más abajo como Tabla 24 en donde las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL que se habían sintetizado y combinado para un ensayo funcional adicional, están en negrita y subrayadas.

10 Tabla 24: Las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL sometidas a ensayo funcional son representativas de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL identificadas en el repertorio inmune humano no activado

pos	V pesada	V ligera	%
-----	----------	----------	---

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
1	IGHV4-34	IGKV3-20	1,56
2	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV3-15</u>	1,19
3	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,97
4	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,89
	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,89
5	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,82
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,82
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,82
6	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,74
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,74
	IGHV4-59	IGKV3-20	0,74
7	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,67
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,67
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,67
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,67
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,67
	IGHV4-39	IGLV 2-8	0,67
8	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,59
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,59
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,59
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,59
	IGHV4-59	IGLV 1-40	0,59
	IGHV4-34	IGLV 2-14	0,59
9	IGHV3-23	IGKV4-1	0,52
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,52

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV5-51	IGKV4-1	0,52
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,52
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,52
	IGHV4-34	IGLV 1-51	0,52
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,52
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,52
10	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,45
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,45
	IGHV3-30	IGKV4-1	0,45
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,45
	IGHV4-59	IGKV4-1	0,45
	IGHV4-34	IGKV3-15	0,45
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,45
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,45
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,45
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,45
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,45
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,45
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,45
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,45
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,45
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,45
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,45
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,45
11	IGHV3-23	<u>IGKV2-28/2D-28</u>	0,37
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,37

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,37
	IGHV1-69	IGKV4-1	0,37
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,37
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,37
	IGHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,37
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,37
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,37
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,37
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,37
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,37
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,37
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,37
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,37
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,37
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,37
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,37
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,37
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,37
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,37
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,37
12	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,30
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,30
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,30
	IGHV4-39	IGKV1-33/1D-33	0,30
	IGHV4-59	IGKV3-11	0,30
	IGHV4-34	IGKV1-5	0,30

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,30
	IGHV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,30
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,30
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,30
	IGHV5-51	IGKV2-28/2D-28	0,30
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,30
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,30
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,30
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,30
	IGHV3-21	IGKV4-1	0,30
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,30
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,30
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,30
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,30
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,30
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,30
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,30
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,30
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,30
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,30
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,30
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,30
	IGHV4-39	IGLV 1-44	0,30
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,30
	IGHV4-59	IGLV 1-51	0,30
	IGHV4-34	IGLV 1-40	0,30

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV4-34	IGLV 1-47	0,30
	IGHV4-34	IGLV 2-8	0,30
	IGHV5-51	IGLV 1-44	0,30
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,30
	IGHV1-69	IGLV 2-8	0,30
	IGHV3-9	IGLV 2-14	0,30
	IGHV3-9	IGLV 2-23	0,30
	IGHV4-4	IGLV 1-44	0,30
	IGHV4-61	IGLV 1-44	0,30
13	IGHV3-23	IGKV1-8	0,22
	IGHV3-30	IGKV2-28/2D-28	0,22
	IGHV4-39	IGKV4-1	0,22
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,22
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,22
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,22
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,22
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,22
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,22
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,22
	IGHV3-48	IGKV1-8	0,22
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,22
	IGHV3-15	IGKV1-33/1D-33	0,22
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,22
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,22
	IGHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,22
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,22

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,22
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,22
	IGHV3-33	IGKV4-1	0,22
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,22
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,22
	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,22
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,22
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,22
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,22
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-61	IGKV4-1	0,22
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,22
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,22
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,22
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,22
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,22
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,22
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,22
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,22
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,22
	IGHV3-15	IGLV 1-44	0,22
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,22
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,22
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,22

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,22
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,22
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,22
	IGHV3-9	IGLV 1-44	0,22
	IGHV3-9	IGLV 1-47	0,22
	IGHV3-9	IGLV 2-11	0,22
	IGHV1-46	IGLV 1-44	0,22
	IGHV1-8	IGLV 2-14	0,22
14	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,15
	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,15
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,15
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV3-30	IGKV1D-8	0,15
	IGHV4-39	IGKV2-28/2D-28	0,15
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,15
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,15
	IGHV4-59	IGKV1-5	0,15
	IGHV4-59	IGKV3-15	0,15
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,15
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,15
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,15
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,15
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,15

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-69	IGKV1-8	0,15
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,15
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,15
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,15
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-13	0,15
	IGHV1-18	IGKV4-1	0,15
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,15
	IG HV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,15
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,15
	IGHV3-21	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-21	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-15	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,15
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,15
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,15
	IGHV4-31	IGKV2-28/2D-28	0,15
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,15
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,15
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,15
	IGHV3-33	IGKV2-28/2D-28	0,15
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,15
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,15
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,15
	IGHV3-53	IGKV1-8	0,15

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,15
	IGHV3-11	IGKV4-1	0,15
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,15
	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,15
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,15
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-9	IGKV1-16	0,15
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,15
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,15
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,15
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,15
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV1-39/1D-39</u>	0,15
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,15
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,15
	IGHV4-4	IGKV2D-29	0,15
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,15
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,15
	IGHV4-61	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-24	IGKV3-11	0,15
	IGHV1-24	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-49	IGKV3-20	0,15
	IGHV3-64	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-64	IGKV3-11	0,15
	IGHV7-81	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,15

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-13	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-72	IGKV3-15	0,15
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 1-40</u>	0,15
	IGHV3-30	IGLV 1-44	0,15
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,15
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,15
	IGHV3-30	IGLV 9-49	0,15
	IGHV4-39	IGLV2-18	0,15
	IGHV4-59	IGLV 2-23	0,15
	IGHV4-59	IGLV 2-11	0,15
	IGHV4-34	IGLV 1-44	0,15
	IGHV4-34	IGLV 2-23	0,15
	IGHV4-34	IGLV 3-25	0,15
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,15
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,15
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,15
	IGHV5-51	IGLV 1-36	0,15
	IGHV5-51	IGLV3-25	0,15
	IGHV1-69	IGLV 1-44	0,15
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,15
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,15
	IGHV1-18	IGLV 1-44	0,15
	IGHV1-18	IGLV 2-8	0,15
	IGHV1-18	IGLV 6-57	0,15
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,15
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,15

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,15
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGLV 2-11</u>	0,15
	IGHV3-15	IGLV 7-46	0,15
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,15
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 1-47</u>	0,15
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,15
	IGHV1-2	IGLV 1-44	0,15
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,15
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGLV 2-23</u>	0,15
	IGHV1-2	IGLV 2-8	0,15
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,15
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGLV 3-1</u>	0,15
	IGHV3-9	IGLV 3-21	0,15
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGLV 3-21</u>	0,15
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGLV 2-14</u>	0,15
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,15
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGLV 1-51</u>	0,15
	IGHV4-61	IGLV 2-11	0,15
	IGHV1-24	IGLV 2-23	0,15
	IGHV1-3	IGLV 2-14	0,15
	IGHV1-3	IGLV 3-1	0,15
	IGHV4-28	IGLV1-44	0,15
	IGHV4-28	IGLV 1-36	0,15
	IGHV3-43	IGLV 1-51	0,15
15	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,07
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,07

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-23</u>	<u>IGKV1-12</u>	0,07
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,07
	IGHV3-23	IGKV3D-20	0,07
	IGHV3-23	IGKV1D-12	0,07
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,07
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,07
	<u>IGHV3-30</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,07
	IGHV3-30	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,07
	IGHV3-30	IGKV2D-30	0,07
	<u>IGHV4-39</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,07
	IGHV4-59	IGKV2-30	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,07
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-12	0,07
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,07
	<u>IGHV5-51</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,07

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,07
	<u>IGHV1-69</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,07
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,07
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,07
	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,07
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,07
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,07
	<u>IGHV3-7</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07
	IGHV3-7	IGKV1D-8	0,07
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,07
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,07
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,07
	<u>IGHV1-18</u>	<u>IGKV1-12</u>	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,07
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,07
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,07
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,07
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-16</u>	0,07
	<u>IGHV3-48</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,07
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,07
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,07
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,07
	<u>IGHV3-21</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,07
	<u>IGHV3-15</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-15	IGKV1D-43	0,07
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,07
	IGHV4-31	IGKV4-1	0,07
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,07
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07
	<u>IGHV4-31</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,07
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,07
	IGHV1-2	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-33/1D-33	0,07
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,07
	<u>IGHV1-2</u>	<u>IGKV1-6</u>	0,07
	<u>IGHV3-33</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,07
	IGHV3-53	IGKV2-28/2D-28	0,07
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,07
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,07
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07
	<u>IGHV3-53</u>	<u>IGKV1-12</u>	0,07
	IGHV3-53	IGKV2-29	0,07
	IGHV3-53	IGKV1D-16	0,07
	IGHV3-11	IGKV1-33/1D-33	0,07

ES 2 511 051 T3

pos	V pesada	V ligera	%
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-9</u>	0,07
	<u>IGHV3-11</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,07
	IGHV3-11	IGKV1D-8	0,07
	IGHV3-9	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,07
	IGHV3-9	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-9	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV3-9	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-9	IGKV1-8	0,07
	IGHV3-9	IGKV1D-8	0,07
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV3-20</u>	0,07
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV3-15</u>	0,07
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV3-11</u>	0,07
	<u>IGHV3-74</u>	<u>IGKV2-30</u>	0,07
	IGHV4-4	IGKV2-28/2D-28	0,07
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV1-17</u>	0,07
	<u>IGHV4-4</u>	<u>IGKV1-27</u>	0,07
	IGHV4-4	IGKV1D-8	0,07
	<u>IGHV1-46</u>	<u>IGKV1-5</u>	0,07
	IGHV1-46	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-61	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,07
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,07
	IGHV1-8	IGKV1-39/1D-39	0,07

pos	V pesada	V ligera	%
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-8	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,07
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-8	IGKV1-9	0,07
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,07
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,07
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,07
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-24	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-24	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,07
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,07
	IGHV1-3	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-3	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-49	IGKV1-5	0,07
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,07
	IGHV3-43	IGKV3-11	0,07

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

Como siguiente etapa, los genes de la línea germinal de VH, Vk y Vλ seleccionados para combinar y someter a ensayo posteriormente, tal y como se muestran en la Tabla 25, se enviaron a Geneart (Regensburg, Alemania) para una optimización de codones con respecto a la expresión en *E. coli* (neutra frente a la expresión en mamífero), y para síntesis.

Tabla 25: Genes de VH, Vλ y Vκ de la línea germinal enviados para síntesis

VH	Vκ	Vλ
1. IGHV3-23	1. IGKV3-20	1. IGLV2-14
2. IGHV3-30	2. IGKV1-39/1D-39	2. IGLV1-40
3. IGHV4-39	3. IGKV1-5	3. IGLV1-51
4. IGHV1-69	4. IGKV3-15	4. IGLV2-23
5. IGHV5-51	5. IGKV3-11	5. IGLV3-21
6. IGHV3-7	6. IGKV2-30	6. IGLV1-47
7. IGHV1-18	7. IGKV1-9	7. IGLV3-1
8. IGHV3-48	8. IGKV1-17	8. IGLV2-11
9. IGHV3-15	9. IGKV1-27	
10. IGHV3-21	10. IGKV1-16	
11. IGHV1-2	11. IGKV1-6	
12. IGHV3-33	12. IGKV1-12	
13. IGHV4-31		
14. IGHV3-53		
15. IGHV3-11		
16. IGHV4-4		
17. IGHV1-46		
18. IGHV3-74		
19. IGHV3-73		
20. IGHV6-1		

Las secuencias de genes de la línea germinal de cada uno de los genes de la línea germinal de VH, Vκ y Vλ se muestran en las Figs. 45-47. Cada secuencia de genes de la línea germinal se sintetizó para incluir lo siguiente:

- 5 a) para VH: secuencia líder (secuencia señal phoA modificada que incorpora un sitio de restricción NheI como se muestra en la Fig. 3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorpora un sitio de restricción BssHII como se muestra en la Fig. 3); CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) del anticuerpo 4D5 como se empleó en Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y la FR4 JH4 (que incorpora un sitio XhoI/Sall RE como se muestra en la Fig. 3);
- 10 b) para Vκ: secuencia líder (secuencia señal ompA modificada que incorpora el sitio de restricción NdeI como se muestra en la Fig. 3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorpora un sitio de restricción BbsI como se muestra en la Fig. 3), CDR-L3 similar a kappa (QQHYTTPPT) según Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; y la FR4 Jk1 (que incorpora un sitio KpnI RE como se muestra en la Fig. 3);
- 15 c) para Vλ: secuencia líder (secuencia señal ompA modificada que incorpora el sitio de restricción NdeI como se muestra en la Fig. 3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la línea germinal (que incorpora un sitio de restricción BbsI como se muestra en la Fig. 3), CDR-L3 similar a lambda (QSYDSSLGTVV) según Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003)

325, 531-553; y la FR4 J12/3 (que incorpora un sitio KpnI RE como se muestra en la Fig. 3).

Ejemplo 6: Ensayo funcional de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL representativas del repertorio inmune humano

5 Las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL se sometieron a ensayo a continuación para analizar las siguientes propiedades: a) presentación relativa después de la producción en fagos y ELISA para fagos en formato Fab; b) niveles de expresión relativa de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis de células de *E. coli* y detección con ELISA de Fab producido; c) termoestabilidad de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis de células de *E. coli* y detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de incubar a temperaturas incrementadas; d) estabilidad en suero bovino/ratón de Fab procedente de lisados de *E. coli* mediante detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de la incubación en suero bovino/ratón; e) niveles de expresión relativa de IgG1 humana después de la producción de IgG1 en células de mamífero y detección con ELISA de IgG1 secretada a partir de material sobrenadante de cultivos celulares; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 humana mediante detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de incubar en suero bovino/ratón.

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

15 El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo sintetizados en el Ejemplo 5, mostrados en la Tabla 25, se clonaron en el vector de presentación de Fab tricistrónico, pJPd1 (Fig. 48) para un ensayo funcional. Las agrupaciones de Fabs se generaron de modo que contuvieran combinaciones de cada uno de los genes principales, los 20 VH combinados con los 8 VL y 12 VK, que produjeron 400 combinaciones que representan la gran mayoría de las parejas de genes de la línea germinal VH/VL más destacadas procedentes del repertorio inmune, tal y como se muestran en la Tabla 18 y las Figs. 39-40.

20 Los fagos que comprendían las parejas de genes anteriores se produjeron a pequeña escala empleando placas de 96 pocillos. Una placa principal se generó relleno cada uno de los pocillos con medio 2xYT/CAM/TET/Gluc e inoculando clones procedentes de las 400 combinaciones de VH/VL, en donde pMORPH30_Vk3-11_AQA / VH3-23_TKA o pMORPH30_Vk3-11_AYA / VH3-23_VLA (pMORPH30 se muestra en la Fig. 51) se emplearon como testigos. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C con agitación. Las placas principales se almacenaron con una concentración final de 15% de glicerol, y se congelaron a -80°C.

Se produjeron placas de 96 pocillos adicionales para la producción en fagos empleando 2xYT/CAM/TET/Gluc como medio y se inocularon clones procedentes de las placas principales descritas anteriormente. Las placas se incubaron a 37°C durante ~2-4 h con agitación a 400 rpm, hasta que se alcanzó una DO600 nm de ~0,5.

30 Las placas se infectaron con 5 µl de fago auxiliar por pocillo (Hyperphage; PROGEN; 1 x 10¹² pfu/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 45 min sin agitación y a continuación durante 60 min con agitación a 400 rpm. Las bacterias se centrifugaron a 2200 g durante 5 min a 4°C.

35 El material sobrenadante que contenía los fagos auxiliares se retiró y los sedimentos de *E. coli* infectados se volvieron a suspender con 2xYT/Cam/TET/Kan/ IPTG sin glucosa. Los sedimentos resuspendidos se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos profundos, rellena previamente con 2xYT/Cm/TET/Kan/ IPTG. Las placas se incubaron durante una noche a 22°C, con agitación. El material sobrenadante que contenía los fagos se recogió mediante centrifugación y se desecharon las células de *E. coli* y los desechos.

Ejemplo 6.2: Evaluación de la presentación en fagos de Fab empleando ELISA

40 El material sobrenadante de los fagos preparado tal y como se ha descrito en el Ejemplo 6.1, se empleó para una clasificación de la presentación de Fab en fagos en ELISAs para fagos.

La presentación de los fragmentos de Fab se evaluó en un ELISA para fagos empleando dos anticuerpos de captura diferentes:

(1) El anticuerpo anti-M13 (Amersham nº 27-9420-01) se empleó para capturar partículas de fago a través de la proteína principal de la cubierta g8p; por lo tanto se pudo determinar el título de fagos.

45 (2) El anticuerpo anti-Fd (The Binding Site nº PC075) se empleó, el cual se une al Fab presentado; con lo que solo se capturan los Fabs que se presentan en fagos.

50 Los anticuerpos de captura respectivos se inmovilizaron sobre placas negras de 96 pocillos de Maxisorp[®] que proporcionaron 100 µl de solución de anticuerpo a una concentración de 7,5 µg/ml para el anticuerpo anti-M13 y una concentración de 1,0 µg/ml para el anticuerpo anti-Fd en pocillos distintos, se selló la placa con una lámina de plástico y se incubó durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con TBST y cada pocillo se bloqueó con 300 µl de CTBST durante 1 h a temperatura ambiente.

El material sobrenadante de los fagos y las muestras de referencia se transfirió para realizar una detección del modo siguiente. Las placas de ELISA bloqueadas se lavaron dos veces con TBST. Se transfirieron 100 µl de material so-

5 brenadante de fagos diluido de forma adecuada en CTBST desde las placas de dilución a las placas de ELISA revestidas, se incubaron durante 1 - 2 h a temperatura ambiente y se lavaron 5x con TBST. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugado de peroxidasa y anti-M13 (Amersham) diluido 1:5000 en CTBST y se incubó durante 1 - 2 h a temperatura ambiente. La solución de trabajo Quanta Blu (Pierce) se preparó mezclando 1 parte de solución de peróxido (p. ej., 0,5 ml) con 9 partes de solución de sustrato (p. ej., 4,5 ml) y se equilibró a temperatura ambiente durante al menos 30 min. Las placas de ELISA se lavaron 5x con TBST, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de trabajo QuantaBlu. La fluorescencia se midió después de incubar durante ~ 2 min (excitación: 320 nm, emisión: 430 nm) y posteriormente a intervalos de 5 min.

10 La evaluación de los datos del ELISA se completó del modo siguiente: se crearon curvas de calibración empleando una preparación de fagos de referencia HuCAL GOLD (VH3 kappa + lambda) y se calcularon los títulos del material sobrenadante de los fagos y los testigos. Para cada muestra, el título de anti-Fd se dividió entre el título de anti-M13 (anti-pVIII), la relación resultante es la tasa de presentación relativa.

15 La tasa de presentación relativa en Fab se calculó empleando un patrón interno (preparación de fagos HuCAL GOLD VH3 kappa + lambda), que no está disponible al público. La tasa de presentación relativa se evaluó como una clasificación. Al clasificar los valores de presentación relativa, un experto en la técnica puede reproducir el método anterior empleando cualquier testigo. Por ejemplo, cada pareja de proteínas de la línea germinal presenta una cantidad en relación con un testigo. Por lo tanto, las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen la tasa de presentación relativa más elevada en comparación con nuestro testigo, tendrán también la mayor tasa de presentación relativa en comparación con cualquier testigo, a pesar de que las tasas de presentación relativa específicas podrían diferir. Por lo tanto, se creó una clasificación de los valores empleando los datos de presentación relativa mostrados en la Figura 55, también mostrados en la Tabla 32, en donde los datos se clasificaron desde el valor más alto al más bajo. Esta clasificación se muestra en la Tabla 26. A partir de esto, se pueden identificar las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden una tasa de presentación relativa dentro del 10%, 20%, 30%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80% y 90% superior de Fabs sometidos a ensayo.

25 Específicamente, a partir de las 400 parejas sometidas a ensayo, se obtuvieron valores de presentación relativa para 196 parejas, véase la Tabla 26. Por lo tanto, un experto en la técnica puede determinar exactamente qué parejas de proteínas de la línea germinal entran dentro del 10%, 20%, 30%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80% o 90% superior de Fabs sometidos a ensayo. Por ejemplo, el 75% superior incluye las parejas de proteínas de la línea germinal clasificadas como los nº 1-147 en la Tabla 26.

30 **Tabla 26: Clasificación de los valores de presentación relativa de Fabs**

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
1	hVH_3_11	hVK_1_39	29,0
2	hVH_3_07	hVK_1_39	27,3
3	hVH_3_15	hVK_3_11	19,4
4	hVH_3_23	hVK_1_27	17,1
5	hVH_3_33	hVL_2-23	17,1
6	hVH_3_15	hVL_1-40	16,7
7	hVH_3_30	hVL_3-21	16,6
8	hVH_3_21	hVK_1_06	16,1
9	hVH_3_53	hVK_1_12	14,8
10	hVH_3_15	hVK_1_16	14,5
11	hVH_3_07	hVK_3_15	14,5
12	hVH_3_07	hVK_1_27	14,5

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
13	hVH_3_15	hVK_1_39	14,2
14	hVH_3_23	hVL_2-11	13,6
15	hVH_3_23	hVK_3_20	13,3
16	hVH_3_30	hVK_1_39	13,1
17	hVH_3_15	hVL_1-47	13,0
18	hVH_3_07	hVK_2_30	13,0
19	hVH_3_11	hVL_1-40	12,4
20	hVH_3_33	hVK_3_15	12,3
21	hVH_3_15	hVK_3_15	12,1
22	hVH_3_48	hVK_3_15	12,1
23	hVH_3_21	hVL_3-21	11,8
24	hVH_3_15	hVK_1_06	11,7
25	hVH_3_21	hVK_1_39	11,6
26	hVH_3_15	hVK_1_12	11,5
27	hVH_3_07	hVL_2-14	11,3
28	hVH_3_21	hVK_1_12	11,3
29	hVH_3_53	hVK_1_05	11,1
30	hVH_3_15	hVL_1-51	11,0
31	hVH_3_23	hVK_1_39	10,8
32	hVH_3_53	hVK_1_16	10,7
33	hVH_3_07	hVK_1_12	10,6
34	hVH_3_15	hVL_2-11	10,5
35	hVH_3_07	hVK_1_17	10,5
36	hVH_3_11	hVK_1_16	10,3
37	hVH_3_48	hVL_1-47	10,3
38	hVH_3_23	hVL_1-51	10,2

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
39	hVH_3_15	hVL_2-23	10,1
40	hVH_3_21	hVK_1_05	10,0
41	hVH_3_15	hVK_1_09	10,0
42	hVH_3_74	hVK_3_15	10,0
43	hVH_3_11	hVL_3-21	9,8
44	hVH_3_15	hVL_2-14	9,7
45	hVH_3_53	hVK_3_15	9,6
46	hVH_3_30	hVL_2-23	9,5
47	hVH_3_74	hVK_1_06	9,5
48	hVH_3_15	hVL_3-1	9,4
49	hVH_3_48	hVL_2-23	9,3
50	hVH_3_15	hVL_3-21	9,2
51	hVH_3_30	hVK_1_27	9,1
52	hVH_3_23	hVL_2-14	9,1
53	hVH_3_48	hVK_1_27	8,9
54	hVH_3_15	hVK_3_20	8,9
55	hVH_3_11	hVL_2-23	8,9
56	hVH_3_21	hVL_2-23	8,8
57	hVH_3_74	hVL_1-40	8,8
58	hVH_3_30	hVL_3-1	8,8
59	hVH_3_74	hVK_1_39	8,7
60	hVH_3_48	hVK_1_16	8,7
61	hVH_3_74	hVK_1_09	8,7
62	hVH_3_21	hVK_1_27	8,7
63	hVH_3_74	hVK_1_12	8,4
64	hVH_3_11	hVL_2-11	8,4

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
65	hVH_3_23	hVK_1_16	8,4
66	hVH_3_53	hVK_1_09	8,3
67	hVH_4_04*03	hVL_1-47	8,3
68	hVH_3_11	hVK_1_12	8,2
69	hVH_3_07	hVL_1-40	8,2
70	hVH_3_15	hVK_1_05	8,1
71	hVH_3_11	hVL_1-47	8,1
72	hVH_3_74	hVK_1_16	8,0
73	hVH_3_15	hVK_1_27	7,8
74	hVH_3_23	hVL_2-23	7,4
75	hVH_3_23	hVL_3-21	7,4
76	hVH_3_53	hVL_2-11	7,2
77	hVH_6_1	hVL_1-40	7,2
78	hVH_3_74	hVL_1-51	7,1
79	hVH_3_74	hVL_3-1	7,0
80	hVH_3_07	hVK_1_16	7,0
81	hVH_3_07	hVL_2-23	6,9
82	hVH_3_53	hVK_1_27	6,9
83	hVH_3_11	hVK_1_09	6,7
84	hVH_3_07	hVK_1_09	6,7
85	hVH_3_21	hVL_2-14	6,5
86	hVH_3_74	hVK_1_05	6,4
87	hVH_3_11	hVL_2-14	6,4
88	hVH_3_15	hVK_1_17	6,4
89	hVH_3_53	hVL_1-51	6,4
90	hVH_3_53	hVL_2-23	6,3

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
91	hVH_3_07	hVL_1-47	6,3
92	hVH_3_23	hVK_1_09	6,1
93	hVH_3_48	hVL_3-1	6,0
94	hVH_3_11	hVK_1_27	6,0
95	hVH_6_1	hVK_1_09	5,9
96	hVH_1_46	hVL_1-51	5,7
97	hVH_3_11	hVK_1_05	5,5
98	hVH_3_30	hVK_1_12	5,4
99	hVH_1_46	hVL_3-21	5,2
100	hVH_4_04*03	hVL_3-21	5,2
101	hVH_3_53	hVL_3-1	5,1
102	hVH_3_07	hVL_3-1	5,0
103	hVH_3_74	hVK_1_27	5,0
104	hVH_3_21	hVK_1_17	5,0
105	hVH_3_74	hVL-2-14	4,7
106	hVH_3_11	hVK_3_15	4,6
107	hVH_3_23	hVL_3-1	4,6
108	hVH_1_69*01	hVL_3-21	4,6
109	hVH_4_04*03	hVK_1_09	4,5
110	hVH_1_18	hVL_3-1	4,4
111	hVH_1_18	hVL_2-23	4,3
112	hVH_1_46	hVL_3-1	4,3
113	hVH_3_11	hVK_1_06	4,3
114	hVH_3_23	hVK_2_30	4,1
115	hVH_5_51	hVL_3-1	3,8
116	hVH_1_18	hVK_1_39	3,7

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
117	hVH_5_51	hVK_1_39	3,7
118	hVH_3_73	hVK_1_27	3,6
119	hVH_4_39	hVL_3-1	3,6
120	hVH_1_69*01	hVK_1_39	3,5
121	hVH_1_69*01	hVL_3-1	3,4
122	hVH_1_18	hVL_3-21	3,4
123	hVH_6_1	hVK_1_06	3,3
124	hVH_4_04*03	hVK_1_16	3,2
125	hVH_3_74	hVL_1-47	3,2
126	hVH_1_46	hVK_3_15	3,0
127	hVH_5_51	hVL_2-23	3,0
128	hVH_1_46	hVK_1_09	3,0
129	hVH_1_69*01	hVK_1_06	2,9
130	hVH_3_53	hVK_1_17	2,9
131	hVH_1_46	hVL_2-23	2,7
132	hVH_4_04*03	hVL_2-23	2,7
133	hVH_5_51	hVK_1_09	2,6
134	hVH_1_18	hVK_3_15	2,6
135	hVH_1_46	hVK_1_39	2,5
136	hVH_1_18	hVL_2-14	2,5
137	hVH_1_18	hVL_1-40	2,4
138	hVH_4_04*03	hVL_3-1	2,2
139	hVH_1_18	hVK_3_20	2,2
140	hVH_4_39	hVK_1_39	2,1
141	hVH_1_69*01	hVK_1_05	2,1
142	hVH_5_51	hVL_2-14	2,1

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
143	hVH_1_69*01	hVK_1_12	2,1
144	hVH_6_1	hVL_2-23	2,1
145	hVH_4_39	hVL_2-14	2,0
146	hVH_1_18	hVK_1_05	2,0
147	hVH_1_18	hVK_1_16	2,0
148	hVH_1_18	hVL_2-11	1,9
149	hVH_1_18	hVK_2_30	1,9
150	hVH_5_51	hVK_3_15	1,9
151	hVH_5_51	hVK_1_12	1,8
152	hVH_1_69*01	hVL_2-23	1,8
153	hVH_3_74	hVL_3-21	1,8
154	hVH_4_39	hVK_1_06	1,6
155	hVH_1_46	hVL_2-11	1,6
156	hVH_1_69*01	hVK_3_15	1,6
157	hVH_1_18	hVK_1_12	1,6
158	hVH_6_1	hVK_1_12	1,5
159	hVH_4_31	hVL_3-1	1,4
160	hVH_1_46	hVK_1_16	1,3
161	hVH_3_53	hVK_2_30	1,3
162	hVH_5_51	hVK_1_16	1,3
163	hVH_1_46	hVK_1_17	1,3
164	hVH_1_69*01	hVK_1_16	1,2
165	hVH_1_18	hVK_1_27	1,2
166	hVH_6_1	hVL_2-11	1,0
167	hVH_1_69*01	hVK_1_17	0,9
168	hVH_4_39	hVL_2-23	0,9

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
169	hVH_5_51	hVK_2_30	0,9
170	hVH_1_69*01	hVL_2-11	0,8
171	hVH_3_73	hVL_2-23	0,8
172	hVH_4_39	hVK_1_17	0,7
173	hVH_4_39	hVL_1-40	0,6
174	hVH_1_18	hVK_1_06	0,6
175	hVH_3_73	hVK_3_11	0,5
176	hVH_3_73	hVK_1_05	0,4
177	hVH_5_51	hVK_1_27	0,4
178	hVH_6_1	hVL_3-21	0,4
179	hVH_3_73	hVL_3-21	0,4
180	hVH_1_2	hVL_3-1	0,4
181	hVH_4_04*03	hVK_2_30	0,3
182	hVH_3_73	hVK_1_06	0,3
183	hVH_3_73	hVL_1-51	0,3
184	hVH_3_73	hVK_1_09	0,3
185	hVH_3_73	hVK_1_12	0,3
186	hVH_3_73	hVK_1_16	0,3
187	hVH_3_73	hVK_1_39	0,2
188	hVH_3_73	hVK_3_15	0,2
189	hVH_3_73	hVL_2-11	0,2
190	hVH_1_69*01	hVK_1_27	0,2
191	hVH_1_2	hVL_2-11	0,1
192	hVH_1_2	hVK_1_05	0,1
193	hVH_1_2	hVK_1_16	0,1
194	hVH_3_73	hVK_1_17	0,1

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)
195	hVH_1_2	hVK_1_06	0,1
196	hVH_1_2	hVL_2-14	0,1

La Figura 55 muestra las tasas de presentación relativa para la mayoría de las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL.

Ejemplo 6.3: ELISA para el escrutinio de 400 combinaciones de VH/VL para determinar el nivel de expresión de Fab en lisados de E. coli

5 Las placas maestras (MP) se inocularon seleccionando clones transformados con agrupaciones de combinaciones de VH/VL en el vector de expresión de Fab, pJPx1 (mostrado en la Fig. 49) en medio 2YT/Cam/1% de Gluc por pocillo. Estas placas se incubaron a 37°C durante una noche con agitación. Las placas de expresión (EP) se inocularon con 2,5 µl de cultivos procedentes de las MPs en 2YT/Cam/0,1% de Glucosa por pocillo. Los testigos (véase la Tabla 27) se inocularon a partir de reservas en glicerol. Estas placas se incubaron durante 6 h a 37°C y se agitaron, a continuación, se indujo la expresión de Fab añadiendo IPTG e incubando a 22°C durante una noche con agitación. Los lisados de células de E. coli se produjeron añadiendo ácido bórico/EDTA/tampón de lisozima a las EPs (1 h de incubación a 22°C, agitación), y los lisados bacterianos se bloquearon posteriormente con 12,5% de MPBST, agitando al menos durante 30 min a temperatura ambiente. Los lisados de E. coli procedentes de las placas de expresión se diluyeron de forma adecuada en 0,5% de MPBS y se utilizaron en el siguiente ensayo.

La Tabla 27 muestra los anticuerpos de revestimiento sin marcar y los anticuerpos de detección marcados con AP que se utilizaron.

Tabla 27:

	Nombre MOR	Marca-dor	Hospedador	Anticuerpo	Empresa	Número	Concentración	Dilución	Lote
Ac de revestimiento	15	sin marcar	oveja	IgG anti-humana (Fd)	Binding Site	pc075	12,1 mg/ml	1:1000	236366, Exp 2009/10
Ac. de detección	AP27	AP	ratón	anti-FlagM2	Sigma	A9469	1,1 mg/ml	1:5000	048K614 3, nuevo lote

20 La Tabla 28 describe los testigos utilizados.

Tabla 28:

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

25 El ELISA para el escrutinio comprendía las siguientes etapas: revestir 384 pocillos de una placa MaxiSorp con anticuerpos específicos de Fd de IgG anti-humana, diluidos en PBS e incubar durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron 2x con PBST y se bloquearon añadiendo (5% de leche en polvo en PBS) a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 h a TA, con agitación. A continuación, las placas se lavaron de nuevo con PBST y lisados de

E. coli bloqueados previamente, diluidos en 0,5% de MPBS se añadieron y se incubaron durante 1 h con agitación a TA. También se añadieron los testigos nº 3 y 5. Las placas se lavaron a continuación con PBST y el anticuerpo de detección marcado con AP se diluyó en 0,5% de MPBS. El anticuerpo de detección diluido se añadió y a continuación se incubó durante 1 h a TA con agitación suave. La señal se identificó del modo siguiente: lavando los pocillos con TBST y añadiendo 20 µl de AttoPhos (diluido 1:5 en ddH₂O), y realizando una lectura a los 5 min y 7-8 min empleando Tecan (infiniTe F200), programa PrimeScreen.

Los niveles de expresión relativa de Fab se calcularon dividiendo la señal del ELISA de las parejas VH/VL respectivas entre la señal de ELISA del Fab de referencia pMx11_FH VH1-69 VLA_VI1-40 AYA. De este modo, señales de ELISA igualmente altas daban como resultado un nivel de expresión relativa de Fab de 1. El Fab de referencia se expresa en un plásmido pMORPHX11 (mostrado en la Fig. 50) que comprende

- a) una secuencia señal phoA de la cadena pesada modificada que comprende el sitio de restricción C-terminal NheI;
- b) una secuencia señal ompA de la cadena ligera modificada que comprende el sitio de restricción C-terminal NdeI;
- c) las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable del gen de la línea germinal VH1-69* 01 como se muestra en la Figura 45A, d) las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena ligera variable del gen de la línea germinal IGLV1-40 como se muestra en la Figura 47A; e) incorporar la CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) del anticuerpo hu4D5-8 y la secuencia de proteínas de la línea germinal de JH4 para FR4 de la cadena pesada; f) incorporar la región CDR-L3 (QSYDSSLGQV) y la secuencia de proteínas de la línea germinal de JI2/3 para FR4 de la cadena ligera. El hu4D5-8 se describe en Carter P. et al. (1992) "Humanization of an anti-p185Her2 antibody for human cancer therapy" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289). Todos los genes se generaron en Geneart (Regensburg, Alemania).

Los resultados se muestran en la Fig. 56.

Ejemplo 6.4: ELISA para el escrutinio de las 400 combinaciones de VH/VL para determinar la termoestabilidad de Fab en lisados BEL

Las placas de expresión se generaron como en el Ejemplo 6.3. Lisados de E. coli diluidos procedentes de las placas de expresión se incubaron a diferentes temperaturas durante 45 minutos y se emplearon en el siguiente ensayo.

La Tabla 29 muestra los anticuerpos de revestimiento sin marcar y los anticuerpos de detección marcados con AP que se emplearon.

Tabla 29:

	Nombre MOR	Marca-dor	Hospeda-dor	Anticuer-po	Empre-sa	Núme-ro	Concentra-ción	Dilu-ción	Lote
Ac de re-vestimiento	57	Sin mar-car	ratón	Anticuerpo IgG1 monoclonal anti polihistidina (anti 6x-histidina); polipéptidos que contienen un marca-dor de polihistidina	R&D Sys-tems	MAB050	500 µg/ml	1:250	AEJ1708111
Ac de de-tección	AP30	AP	cabra	Cadenas ligeras kappa anti-	Sigma	A3813	2,3 mg/ml	1:2300	018K6069

	Nombre MOR	Marca-dor	Hospeda-dor	Anticuer-po	Empre-sa	Núme-ro	Concentra-ción	Dilu-ción	Lote
				humanas					
Ac de de-tección	AP5	AP	cabra	Cadenas ligeras lambda anti-humanas	Sigma	A2904	0,8 mg/ml	1:800	096K6030

- El ELISA para el escrutinio comprendía las siguientes etapas: 384 pocillos de una placa MaxiSorp se revistieron con anticuerpo de revestimiento (véase la tabla anterior) diluido en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBST y se bloquearon añadiendo 5% de MPBS a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 h a TA con agitación. A continuación los lisados de E. coli diluidos procedentes de las placas de expresión se distribuyeron en cuatro placas de PCR de 96 pocillos (cada uno con aproximadamente 40 µl) y se expusieron a temperaturas diferentes (4°C (sobre hielo), 60°C, 70°C, 80°C y a continuación sobre hielo) en un ciclador de PCR, cada temperatura durante 45 min. Las placas de 384 pocillos bloqueadas se lavaron con PBST, a continuación los lisados de Fab incubados previamente se añadieron a las placas. Las placas se incubaron a continuación 1 h a TA con agitación. Las placas se lavaron con PBST, los anticuerpos de detección marcados con AP se diluyeron en 0,5% de MPBS. Se añadieron 20 µl/pocillo de los anticuerpos de detección diluidos y se incubaron durante 1 h a TA con agitación suave. La señal se identificó del modo siguiente: lavando los pocillos con TBST y añadiendo AttoPhos (diluido 1:5 en ddH₂O) a los pocillos. Se realizó una lectura de la señal en diferentes momentos (5 min a 10 min) empleando Tecan (infiniTe F200), programa PimeScreen.
- Los resultados se muestran en la Fig. 57.

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

- Las placas de expresión se generaron como en el Ejemplo 6.3. Los lisados de E. coli que contenían Fab se diluyeron y se incubaron en suero bovino y de ratón empleando las siguientes etapas: los lisados de E. coli procedentes de las placas de expresión se diluyeron en suero al 50% (volumen total de 100 µl), se añadió Cam 1:1000 para evitar el crecimiento de bacterias y los lisados se dividieron en dos placas de 96 pocillos y ambas placas se congelaron. La primera placa se descongeló y se incubó a 37°C durante 12-13 días. La segunda placa se almacenó a -80°C hasta realizar el ELISA (0 días de incubación a 37°C). La Tabla 30 muestra los anticuerpos de revestimiento sin marcar y los anticuerpos de detección marcados con AP que se emplearon.

Tabla 30:

	Nombre MOR	Marca-dor	Hospeda-dor	Anticuer-po	Empre-sa	Núme-ro	Concentra-ción	Dilu-ción	Lote
Ac de revestimiento	36	Fab	cabra	IgG anti-Humana (H+L)	Jackson Immuno Research	109-006-088	1,3 mg/ml	1:1000	80299
Ac de de-tección	AP30	AP	cabra	Cadenas ligeras kappa anti-humanas	Sigma	A3813	2,3 mg/ml	1:2300	018K6069
Ac de de-tección	AP5	AP	cabra	Cadena ligera lambda	Sigma	A2904	0,8 mg/ml	1:800	096K6030

	Nom- bre MOR	Marca- dor	Hospeda- dor	Anticuer- po	Empre- sa	Núme- ro	Concentra- ción	Dilu- ción	Lote
				anti- humana + libre					

5 El día 11 o 12, los 384 pocillos de una placa MaxiSorp se revistieron con 20 µl de anticuerpo de revestimiento diluido en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBST y se bloquearon añadiendo 5% de MPBS a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 h a TA con agitación. A continuación, las placas de 384 pocillos bloqueadas se lavaron con PBST. Lisados de E. coli en suero procedentes de las muestras a -80°C y 37°C se transfirieron a las placas de ELISA revestidas y se incubaron durante 1 hora a TA con agitación. Las placas se lavaron con PBST y los anticuerpos de detección marcados con AP se diluyeron en 0,5% de MPBS. El anticuerpo de detección marcado con AP se añadió y la placa se incubó durante 1 h a TA con agitación. La señal se identificó del modo siguiente: lavando los pocillos con TBST y añadiendo AttoPhos (diluido 1:5 en ddH₂O) a los pocillos. Se realizó una lectura de la señal en diferentes momentos (5 min a 10 min) empleando Tecan (infiniTe F200), programa PrimeScreen.

Los resultados de los ensayos de la estabilidad en suero bovino se muestran en la Fig. 58.

Los resultados de los ensayos de la estabilidad en suero de ratón se muestran en la Fig. 59.

Ejemplo 7: Generación de logaritmos para la evaluación de las propiedades biofísicas

15 Para la generación de las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL, se subclonaron los 20 genes de la región variable de la cadena pesada en el vector de expresión de IgG1 humana pJP_hlgG1, mostrado en la Fig. 52. Paralelamente, los 12 genes de la región variable de kappa se subclonaron en el vector de expresión de la cadena ligera kappa de mamífero pJP_hlgkappa mostrado en la Fig. 53 y los 8 genes de la región variable de lambda se subclonaron en el vector de expresión de la cadena ligera lambda de mamífero pJP_hlglambda mostrado en la Fig. 54.

Mediante la cotransfección de cada plásmido de expresión de la cadena pesada y de la cadena ligera, se podían producir separadamente todas las 400 parejas VH/VL, clonando solamente 40 estructuras artificiales de expresión. Por lo tanto, las 20 estructuras artificiales de la cadena pesada se cotransfectaron con cada una de las estructuras artificiales de expresión de la cadena ligera en células HEK.EBNA. La IgG1 humana se recogió o se detectó varios días después de la transfección a partir del material sobrenadante de los cultivos celulares.

Ejemplo 7.1: Clasificación de la expresión de IgG

Uno de los criterios para que la selección de los emparejamientos VH/VL se incluya en una genoteca es el nivel de expresión de los 400 emparejamientos VH/VL diferentes en el formato IgG. El nivel de expresión de cada emparejamiento VH/VL en el formato de IgG1 humana se determinó mediante ELISA de tipo sándwich. Para ello, las 400 combinaciones de VH/VL en formato de IgG1 humana se transfectaron en células HEK.EBNA y se expresaron a pequeña escala. El material sobrenadante de los cultivos celulares se recogió después de unos pocos días y se determinaron los niveles de IgG.

Se realizó el siguiente procedimiento. Se revistieron placas de 384 pocillos de MaxiSorpTM con IgG anti-humana de ratón Fcy-pan R10Z8E9 a 2,5 µg/ml en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBST. Las placas se bloquearon con 5% de BSA o 1 x Chemiblocker en PBST y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y se lavaron de nuevo con PBST. El material sobrenadante de expresión de IgG se diluyó en 2,5% de BSA-PBST y las muestras diluidas se añadieron a la placa bloqueada y lavada de ELISA. Se emplearon los siguientes testigos: material sobrenadante vacío y material sobrenadante con un anticuerpo de expresión reducida, un anticuerpo de expresión moderada y un anticuerpo de expresión elevada. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron a continuación con TBST. Se añadió conjugado de biotina con IgG anti-humana de ratón Fcy-pan R10Z8E9 diluido de forma conveniente en 1% de BSA-TBST. Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió estreptavidina-AP diluida 1:2000 en 0,5% de BSA-TBST y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió sustrato fluorescente AttoPhosTM (preparado según las instrucciones del fabricante) diluido en TBST, directamente antes del uso. Después de 5 y 10 min, se midió la fluorescencia a través de un lector de microplacas de Tecan.

Los niveles de expresión relativa de IgG1 se calcularon dividiendo la señal del ELISA de las parejas respectivas VH/VL entre la señal del ELISA de la IgG1 de referencia MOR03080 (mostrada en la Tabla 31). Por lo tanto, señales

de ELISA igualmente elevadas producían un nivel de expresión relativa de IgG1 de 1.

Tabla 31

La secuencia de aminoácidos de MOR03080 es del modo siguiente:

03080 Cadena pesada variable con CDRs en negrita:

(1) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSN**

(51) **IYSDGSNTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNM**

(101) **YRWPFHYFFDYWGQGLTVTVSS**

03080 Cadena ligera variable con CDRs en negrita

(1) DIELTQPPSV SVAPGQTARIS**CSGDNIGNKYVSWYQQKPGQAPVVVIYGD**

(51) **NNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSYDSSYFV**FGGG**

(101) TKLTVLGQ

Los resultados se muestran en la Fig. 60.

Ejemplo 7.2: Clasificación de la estabilidad en suero de IgG1

5 Uno de los criterios para que la selección de los emparejamientos de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable se incluyera en una genoteca es la estabilidad en suero de los 400 emparejamientos diferentes de la cadena ligera variable y la cadena pesada variable en formato IgG. La estabilidad en suero de cada material sobrenadante de anticuerpo IgG se determinó incubando en 50% de suero de ratón durante 14 días y posteriormente un ELISA tipo sándwich con IgG2 anti-humana de ratón (CH2), clon R10Z8E9. De nuevo, las 400 combinaciones de VH/VL en formato de IgG1 humana se transfectaron en células HEK.EBNA y se expresaron a pequeña escala. El material sobrenadante de los cultivos celulares se recogió pocos días después y se sometieron a ensayo las IgGs en el material sobrenadante para estudiar la estabilidad en suero.

15 Se realizó el siguiente procedimiento. Se revistieron placas de 384 pocillos de MaxiSorp™ con IgG anti-humana de ratón Fcy-pan R10Z8E9 a 2,5 µg/ml en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBST y luego se bloquearon con 5% de BSA-PBST o 1 x Chemiblocker durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron con PBST. El material sobrenadante de los cultivos celulares que contenía IgG1 se diluyó en a) 2,5% de BSA-PBST y b) en 50% de suero de ratón y se incubó a 37°C durante al menos 14 días y estas muestras se añadieron a la placa de ELISA bloqueada y lavada. Se emplearon los siguientes testigos: material sobrenadante vacío y material sobrenadante con un anticuerpo de expresión reducida, un anticuerpo con expresión moderada y un anticuerpo con expresión elevada. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió conjugado de biotina con IgG anti-humana de ratón Fcy-pan R10Z8E9 diluido hasta 0,8 µl/ml en 1% de BSA-TBST. Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió estreptavidina-AP diluida 1:2000 en 0,5% de BSA-TBST. Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron con TBST. Se añadió sustrato fluorescente AttoPhos™ (preparado según las instrucciones del fabricante) diluido 1:5 en TBST, directamente antes del uso. Después de 5 y 10 min, se midió la fluorescencia a través de un lector de microplacas de Tecan.

Los resultados se muestran en la Fig. 61.

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

30 Una vez que se sometieron a ensayo las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL para estudiar las siguientes propiedades a) presentación relativa después de la producción en fagos y ELISA para fagos en formato Fab; b) niveles de expresión relativa de Fab después de la producción de Fab en E. coli, lisis de células de E. coli y detección con ELISA de Fab producido; c) termoestabilidad de Fab después de la producción de Fab en E. coli, lisis de células de E. coli y detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de incubar a temperaturas incrementadas; d) estabilidad en suero bovino/ratón de Fab procedente de lisados de E. coli mediante detección con ELISA de Fab no desnaturalizado, después de la incubación en suero bovino/ratón; e) niveles de expresión relativa de IgG1 humana después de la producción de IgG1 en células de mamífero y detección con ELISA de IgG1 secretada a par-

ES 2 511 051 T3

tir del material sobrenadante de cultivos celulares; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 humana mediante detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de incubar en suero bovino/ratón; a continuación, la siguiente etapa era seleccionar las parejas de la línea germinal VH/VL que se iban a incorporar en la colección.

5 Los resultados del ensayo funcional para cada pareja de proteínas de la línea germinal VH/VL se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32: Compilación de datos funcionales para cada una de las 400 parejas de genes de la línea germinal VH/VL

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
1	hVK_1_2	hVK_1_05	0,1	0,0	bg	U	S	10	0,0	bg
2	hVK_1_2	hVK_1_06	0,1	0,2	60	S	S	42	0,0	bg
3	hVK_1_2	hVK_1_09	0,0	0,0	bg	U	s	11	0,0	bg
4	hVK_1_2	hVK_1_12	0,0	0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
5	hVH_1_2	hVK_1_16	0,1	0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
6	hVH_1_2	hVK_1_17	0,0	0,0	bg	S	S	21	0,0	bg
7	hVH_1_2	hVK_1_27	0,0	0,1	bg	S	S	22	0,0	bg
8	hVK_1_2	hVK_1_39	0,0	0,0	bg	S	S	21	0,0	bg
9	hVK_1_2	hVK_2_30		0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
10	hVK_1_2	hVH_3_11	0,0	0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
11	hVK_1_2	hVK_3_15	0,0	0,0	bg	U	S	10	0,0	bg
12	hVK_1_2	hVK_3_20		0,0	bg	S	S	21	0,0	bg
13	hVK_1_2	hVL_1-40						0	0,3	bg
14	hVK_1_2	hVL_1-47	0,0	0,0	4	U	U	2	0,0	bg

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
15	hVH_1_2	hVL_1-51	0,0	0,0	4	U	U	0	0,4	bg
16	hVH_1_2	hVL_2-11	0,1	0,0	4	S	S	22	0,3	bg
17	hVH_1_2	hVL_2-14	0,1	0,0	4	U	U	0	0,1	bg
18	hVH_1_2	hVL_2-23	0,0	0,0	4	U	U	0	0,0	bg
19	hVH_1_2	hVL_3-1	0,4	0,0	4	U	U	1	0,0	bg
20	hVK_1_2	hVL_3-21	0,0	0,0	4	U	U	0	0,0	bg
21	<u>hVH 1 1</u> <u>8</u>	<u>hVK 1</u> <u>05</u>	<u>2.0</u>	<u>0.4</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>54</u>	<u>0.4</u>	<u>S</u>
22	hVH_1_18	hVK_1_06	0,6	0,5	60	S	S	56	0,2	S
23	hVH_1_18	hVK_1_09						0	0,1	S
24	hVH_1_18	hVK_1_12	1,6	0,5	60	S	S	56	0,1	bg
25	hVH_1_18	hVK_1_16	2,0					3	0,2	S
26	hVH_1_18	hVK_1_17		0,5		S	S	38	0,3	S
27	hVH_1_18	hVK_1_27	1,2	0,4	70	S	S	62	0,5	S
28	hVH_1_18	hVK_1_39	3,7	0,3	60	S	S	53	0,1	S
29	hVH_1_18	hVK_2_30	1,9	0,5	60	S	S	56	0,0	S
30	hVH_1_18	hVK_3_11		0,6	60	S	S	56	0,0	S
31	hVH_1_18	hVK_3_15	2,6	0,5	70	S	S	67	0,3	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
32	hVH_1_18	hVK_3_20	2,2	0,9	60	S	S	72	0,0	S
33	hVH_1_18	hVL_1-40	2,4					4	0,5	S
34	hVH_1_18	hVL_1-47		0,8	60	S	S	66	0,4	U
35	hVH_1_18	hVL_1-51						0	0,5	S
36	hVH_1_18	hVL_2-11	1,9					3	0,5	U
37	hVH_1_18	hVL_2-14	2,5	0,6	60	S	S	64	0,5	U
38	<u>hVH 1 1</u> <u>8</u>	<u>hVL 2-</u> <u>23</u>	<u>4.3</u>	<u>0.7</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>70</u>	<u>0.4</u>	<u>S</u>
39	hVH_1_18	hVL_3-1	4,4	0,6	60	S	S	65	0,2	U
40	hVH_1_18	hVL_3-21	3,4	0,6	60	S	S	64	0,2	S
41	hVH_1_46	hVK_1_05		0,4	60	S	S	51	0,9	S
42	hVH_1_46	hVK_1_06						0	0,9	S
43	<u>hVH 1 4</u> <u>6</u>	<u>hVK 1</u> <u>09</u>	<u>3.0</u>	<u>0.6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>63</u>	<u>0.4</u>	<u>S</u>
44	hVH_1_46	hVK_1_12		0,5	60	S	S	55	0,2	S
45	hVH_1_46	hVK_1_16	1,3	0,6	60	S	S	61	0,3	S
46	hVH_1_46	hVK_1_17	1,3					2	0,5	S
47	hVH_1_46	hVK_1_27						0	0,6	S
48	<u>hVH 1 4</u> <u>6</u>	<u>hVK 1</u> <u>39</u>	<u>2.5</u>	<u>0.4</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>55</u>	<u>0.5</u>	<u>S</u>

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
49	hVH_1_46	hVK_2_30		0,2	4	U	S	16	0,0	S
50	hVH_1_46	hVK_3_11						0	0,1	S
51	<u>hVH 1 4</u> <u>6</u>	<u>hVK 3</u> <u>15</u>	<u>3,0</u>	<u>0,7</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>68</u>	<u>0,4</u>	<u>S</u>
52	hVH_1_46	hVK_3_20						0	0,1	S
53	hVH_1_46	hVL_1-40		1,0	60	S	S	73	0,9	S
54	hVH_1_46	hVL_1-47						0	0,6	U
55	hVH_1_46	hVL_1-51	5,7					10	0,3	S
56	hVH_1_46	hVL_2-11	1,6					3	0,3	S
57	hVH_1_46	hVL_2-14						0	0,3	U
58	hVH_1_46	hVL_2-23	2,7	1,0	60	S	S	79	0,3	S
59	hVH_1_46	hVL_3-1	4,3					7	0,4	S
60	hVH_1_46	hVL_3-21	5,2					9	0,3	S
61	<u>hVH 1 6</u> <u>9*01</u>	<u>hVK 1</u> <u>05</u>	<u>2,1</u>	<u>0,5</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>59</u>	<u>0,9</u>	<u>S</u>
62	hVH_1_69*01	hVK_1_06	2,9					5	0,5	S
63	hVH_1_69*01	hVK_1_09		0,3	60	S	U	37	0,4	S
64	hVH_1_69*01	hVK_1_12	2,1	0,4	60	S	S	53	0,3	S
65	hVH_1_69*01	hVK_1_16	1,2					2	0,4	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
66	hVH_1_69*01	hVK_1_17	0,9	0,3	4	S	S	31	0,3	S
67	hVH_1_69*01	hVK_1_27	0,2	0,3	70	S	S	56	0,4	S
68	hVH_1_69*01	hVK_1_39	3,5	0,1	4	S	S	31	0,4	U
69	hVH_1_69*01	hVK_2_30						0	0,0	S
70	hVH_1_69*01	hVK_3_11		0,7	60	S	S	60	0,0	S
71	hVH_1_69*01	hVK_3_15	1,6	0,5	70	S	S	66	0,5	S
72	hVH_1_69*01	hVK_3_20		0,5	60	S	S	54	0,0	S
73	hVH_1_69*01	hVL_1-40		1,0	60	S	S	72	0,2	S
74	hVH_1_69*01	hVL_1-47						0	0,2	U
75	hVH_1_69*01	hVL_1-51		0,8	60	S	S	64	0,3	S
76	hVH_1_69*01	hVL_2-11	0,8	0,7	60	S	S	65	0,2	S
77	hVH_1_69*01	hVL_2-14		0,8	60	S	S	64	0,3	U
78	hVH_1_69*01	hVL_2-23	1,8					3	0,3	s
79	hVH_1_69*01	hVL_3-1	3,4	0,7		S	S	52	0,2	S
80	hVH_1_69*01	hVL_3-21	4,6	0,7	60	S	S	71	0,1	S
81	hVH_3_07	hVK_1_05		0,7	60	S	S	63	0,9	U
82	hVH_3_07	hVK_1_06		0,9	60	S	S	69	1,3	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
83	<u>hVH 3 0</u> <u>7</u>	<u>hVK 1</u> <u>09</u>	<u>6.7</u>	<u>0.4</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>50</u>	<u>1.5</u>	<u>S</u>
84	<u>hVH 3 0</u> <u>7</u>	<u>hVK 1</u> <u>12</u>	<u>10.6</u>	<u>0.9</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>97</u>	<u>0.9</u>	<u>S</u>
85	hVH_3_07	hVK_1_16	7,0					12	1,5	S
86	hVH_3_07	hVK_1_17	10,5	0,5	4	S	S	40	0,9	S
87	<u>hVH 3 0</u> <u>7</u>	<u>hVK 1</u> <u>27</u>	<u>14.5</u>	<u>0.5</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>87</u>	<u>1.8</u>	<u>S</u>
88	hVH_3_07	hVK_1_39	27,3	0,3	60	U	S	85	1,2	S
89	hVH_3_07	hVK_2_30	13,0					0	0,3	S
90	hVH_3_07	hVK_3_11						0	0,4	S
91	<u>hVH 3 0</u> <u>7</u>	<u>hVK 3</u> <u>15</u>	<u>14.5</u>	<u>0.7</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>95</u>	<u>1.8</u>	<u>S</u>
92	hVH_3_07	hVK_3_20						0	0,4	S
93	hVH_3_07	hVL_1-40	8,2					14	0,3	S
94	<u>hVH 3 0</u> <u>7</u>	<u>hVL 1-</u> <u>47</u>	<u>6.3</u>	<u>1.2</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>90</u>	<u>0.8</u>	<u>U</u>
95	hVH_3_07	hVL_1-51		1,0	60	S	S	74	0,9	S
96	hVH_3_07	hVL_2-11						0	1,2	S
97	hVH_3_07	hVL_2-14	11,3					19	0,8	U
98	<u>hVH 3 0</u> <u>7</u>	<u>hVL 2-</u> <u>23</u>	<u>6.9</u>	<u>0.8</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>76</u>	<u>0.7</u>	<u>S</u>
99	<u>hVH 3 0</u> <u>7</u>	<u>hVL 3-</u> <u>1</u>	<u>5.0</u>	<u>0.5</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>64</u>	<u>1.2</u>	<u>S</u>

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
100	hVH_3_07	hVL_3-21		0,7	60	S	S	61	0,3	S
101	<u>hVH 3 1</u> <u>1</u>	<u>hVK 1</u> <u>05</u>	<u>5.5</u>	<u>0.5</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>65</u>	<u>0.5</u>	<u>S</u>
102	<u>hVH 3 1</u> <u>1</u>	<u>hVK 1</u> <u>06</u>	<u>4.3</u>	<u>0.6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>64</u>	<u>1.4</u>	<u>S</u>
103	hVH_3_11	hVK_1_09	6,7					0	0,9	S
104	<u>hVH 3 1</u> <u>1</u>	<u>hVK 1</u> <u>12</u>	<u>8.2</u>	<u>0.6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>73</u>	<u>0.9</u>	<u>S</u>
105	<u>hVH 3 1</u> <u>1</u>	<u>hVK 1</u> <u>16</u>	<u>10.3</u>	<u>0.6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>U</u>	<u>61</u>	<u>1.2</u>	<u>S</u>
106	hVH_3_11	hVK_1_17						0	0,9	S
107	hVH_3_11	hVK_1_27	6,0					0	1,7	S
108	hVH_3_11	hVK_1_39	29,0					50	1,8	S
109	hVH_3_11	hVK_2_30		0,4	4	S	S	34	1,1	U
110	hVH_3_11	hVH_3_11	0,0					0	0,6	S
111	<u>hVH 3 1</u> <u>1</u>	<u>hVK 3</u> <u>15</u>	<u>4.6</u>	<u>0.7</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>68</u>	<u>1.6</u>	<u>S</u>
112	hVH_3_11	hVK_3_20						0	0,2	S
113	hVH_3_11	hVL_1-40	12,4					21	0,3	S
114	<u>hVH 3 1</u> <u>1</u>	<u>hVL 1-</u> <u>47</u>	<u>8.1</u>	<u>0.8</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>80</u>	<u>1.3</u>	<u>U</u>
115	hVH_3_11	hVL_1-51		1,1	60	S	S	77	1,9	S
116	hVH_3_11	hVL_2-11	8,4					14	1,1	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
117	hVH_3_11	hVL_2-14	6,4	0,9	60	S	S	81	0,4	U
118	<u>hVH 3 1</u> <u>1</u>	<u>hVL 2-</u> <u>23</u>	<u>8,9</u>	<u>1,0</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>88</u>	<u>0,4</u>	<u>S</u>
119	hVH_3_11	hVL_3-1		0,5	60	S	S	53	1,6	S
120	hVH_3_11	hVL_3-21	9,8					17	0,3	S
121	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVK 1</u> <u>05</u>	<u>8,1</u>	<u>0,5</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>68</u>	<u>0,4</u>	<u>S</u>
122	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVK 1</u> <u>06</u>	<u>11,7</u>	<u>0,6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>79</u>	<u>0,8</u>	<u>S</u>
123	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVK 1</u> <u>09</u>	<u>10,0</u>	<u>0,5</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>80</u>	<u>0,9</u>	<u>S</u>
124	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVK 1</u> <u>12</u>	<u>11,5</u>	<u>0,7</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>90</u>	<u>0,7</u>	<u>S</u>
125	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVK 1</u> <u>16</u>	<u>14,5</u>	<u>0,7</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>86</u>	<u>1,5</u>	<u>S</u>
126	hVH_3_15	hVK_1_17	6,4	0,6	4	U	U	30	0,8	S
127	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVK 1</u> <u>27</u>	<u>7,8</u>	<u>0,5</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>77</u>	<u>1,7</u>	<u>S</u>
128	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVK 1</u> <u>39</u>	<u>14,2</u>	<u>0,4</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>76</u>	<u>1,8</u>	<u>S</u>
129	hVH_3_15	hVK_2_30		0,3	4	S	u	23	0,6	S
130	hVH_3_15	hVK_3_11	19,4					33	0,8	S
131	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVK 3</u> <u>15</u>	<u>12,1</u>	<u>0,6</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>70</u>	<u>1,9</u>	<u>S</u>
132	hVH_3_15	hVK_3_20	8,9					0	0,5	S
133	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVL 1-</u> <u>40</u>	<u>16,7</u>	<u>0,9</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>98</u>	<u>0,1</u>	<u>S</u>

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
134	hVH_3_15	hVL_1-47	13,0	1,2	60	S	S	102	0,2	U
135	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVL 1-</u> <u>51</u>	<u>11,0</u>	<u>1,1</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>94</u>	<u>0,9</u>	<u>S</u>
136	<u>hVH 3 1</u> <u>5</u>	<u>hVL 2-</u> <u>11</u>	<u>10,5</u>	<u>0,9</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>88</u>	<u>0,8</u>	<u>S</u>
137	hVH_3_15	hVL_2-14	9,7	0,8	60	S	S	83	0,9	U
138	hVH_3_15	hVL_2-23	10,1					17	0,4	S
139	hVH_3_15	hVL_3-1	9,4	0,3	4	S	S	46	1,0	S
140	hVH_3_15	hVL_3-21	9,2	0,8		S	S	65	0,2	S
141	hVH_3_21	hVK_1_05	10,0					17	0,8	S
142	<u>hVH 3 2</u> <u>1</u>	<u>hVK 1</u> <u>06</u>	<u>16,1</u>	<u>1,0</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>99</u>	<u>0,9</u>	<u>S</u>
143	hVH_3_21	hVK_1_09						0	0,4	S
144	<u>hVH 3 2</u> <u>1</u>	<u>hVK 1</u> <u>12</u>	<u>11,3</u>	<u>0,6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>77</u>	<u>0,5</u>	<u>S</u>
145	hVH_3_21	hVK_1_16		0,9	60	S	S	68	0,0	S
146	hVH_3_21	hVK_1_17	5,0					9	0,0	S
147	<u>hVH 3 2</u> <u>1</u>	<u>hVK 1</u> <u>27</u>	<u>8,7</u>	<u>0,6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>78</u>	<u>0,5</u>	<u>S</u>
148	<u>hVH 3 2</u> <u>1</u>	<u>hVK 1</u> <u>39</u>	<u>11,6</u>	<u>0,5</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>54</u>	<u>0,8</u>	<u>S</u>
149	hVH_3_21	hVK_2_30		0,6	4	S	S	44	0,1	U
150	hVH_3_21	hVK_3_11						0	0,2	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
15 1	hVH_3_21	hVK_3_15		0,8	60	S	S	65	0,3	S
15 2	hVH_3_21	hVK_3_20						0	0,5	S
15 3	hVH_3_21	hVL_1-40		1,0	60	S	S	72	0,5	S
15 4	hVH_3_21	hVL_1-47	0,0	1,2	60	S	S	81	0,3	S
15 5	hVH_3_21	hVL_1-51						0	0,9	S
15 6	hVH_3_21	hVL_2-11		0,9	60	S	S	68	0,7	S
15 7	hVH 3 2 1	hVL 2- 14	6.5	0.9	60	S	S	81	1.2	S
15 8	hVH 3 2 1	hVL 2- 23	8.8	1.0	60	S	S	90	0.9	S
15 9	hVH_3_21	hVL_3-1		0,7	60	S	S	60	0,4	S
16 0	hVH_3_21	hVL_3-21	11,8	0,9	60	S	S	88	0,1	S
16 1	hVH_3_23	hVK_1_05		0,8	60	S	S	64	0,2	S
16 2	hVH_3_23	hVK_1_06		0,7	60	S	S	61	0,2	S
16 3	hVH_3_23	hVK_1_09	6,1	0,8	70	S	S	86	0,1	S
16 4	hVH_3_23	hVK_1_12		0,9	60	S	S	68	0,1	S
16 5	hVH_3_23	hVK_1_16	8,4	0,6	60	S	S	72	0,2	S
16 6	hVH_3_23	hVK_1_17		0,6	4	S	U	31	0,1	S
16 7	hVH_3_23	hVK_1_27	17,1					29	0,2	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
168	hVH_3_23	hVK_1_39	10,8					19	0,3	S
169	hVH_3_23	hVK_2_30	4,1	0,3	4	S	S	39	0,0	bg
170	hVH_3_23	hVH_3_11						0	0,0	bg
171	hVH_3_23	hVK_3_15		0,7	70	S	S	73	0,4	S
172	hVH_3_23	hVK_3_20	13,3					0	0,2	S
173	hVH_3_23	hVL_1-40						0	0,1	S
174	hVH_3_23	hVL_1-47						0	0,1	S
175	hVH_3_23	hVL_1-51	10,2	1,1	60	S	S	94	0,2	S
176	hVH_3_23	hVL_2-11	13,6					23	0,1	S
177	hVH_3_23	hVL_2-14	9,1					16	0,3	S
178	hVH_3_23	hVL_2-23	7,4	0,9	60	S	S	82	0,3	S
179	hVH_3_23	hVL_3-1	4,6	0,4	60	S	S	60	0,1	S
180	hVH_3_23	hVL_3-21	7,4	0,8	60	S	S	78	0,1	S
181	hVH_3_30	hVK_1_05						0	0,7	S
182	hVH_3_30	hVK_1_06		1,0	60	S	S	75	0,6	S
183	hVH_3_30	hVK_1_09						0	0,3	S
184	hVH_3_30	hVK_1_12	5,4	0,8	60	S	S	73	0,3	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
185	hVH_3_30	hVK_1_16		0,9	60	S	S	69	0,4	S
186	hVH_3_30	hVK_1_17						0	0,5	S
187	hVH_3_30	hVK_1_27	9,1	0,4	60	S	U	38	0,5	S
188	hVH_3_30	hVK_1_39	13,1	0,0	bg	U	U	19	1,0	S
189	hVH_3_30	hVK_2_30		0,4	4	S	U	23	0,1	bg
190	hVH_3_30	hVK_3_11		0,4	60	S	S	50	0,1	S
191	hVH_3_30	hVK_3_15		0,7	60	S	S	61	0,9	S
192	hVH_3_30	hVK_3_20		0,7	60	S	S	63	0,4	S
193	hVH_3_30	hVL_1-40						0	0,8	S
194	hVH_3_30	hVL_1-47		1,1	60	S	S	78	0,3	S
195	hVH_3_30	hVL_1-51						0	0,4	S
196	hVH_3_30	hVL_2-11		0,7	60	S	S	62	0,4	S
197	hVH_3_30	hVL_2-14		0,8	60	S	S	66	1,0	S
198	hVH 3 3 0	hVL 2-23	9.5	1.0	60	S	S	89	0.5	S
199	hVH 3 3 0	hVL 3-1	8.8	0.6	60	S	S	73	0.5	S
200	hVH_3_30	hVL_3-21	16,6	0,8	60	S	S	93	0,2	S
201	hVH_3_33	hVK_1_05		0,3	60	S	S	46	0,0	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
20 2	hVH_3_33	hVK_1_06						0	0,6	S
20 3	hVH_3_33	hVK_1_09		0,7	60	S	S	60	0,2	S
20 4	hVH_3_33	hVK_1_12		0,2	60	S	U	34	0,2	S
20 5	hVH_3_33	hVK_1_16						0	0,4	S
20 6	hVH_3_33	hVK_1_17						0	0,5	S
20 7	hVH_3_33	hVK_1_27		0,6	60	S	S	57	0,2	S
20 8	hVH_3_33	hVK_1_39						0	0,8	S
20 9	hVH_3_33	hVK_2_30						0	0,3	S
21 0	hVH_3_33	hVH_3_11						0	0,6	S
<u>21</u> <u>1</u>	<u>hVH 3 3</u> <u>3</u>	<u>hVK 3</u> <u>15</u>	<u>12,3</u>	<u>0,6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>77</u>	<u>0,9</u>	<u>S</u>
21 2	hVH_3_33	hVK_3_20		1,0	60	S	S	72	0,3	S
21 3	hVH_3_33	hVL_1-40						0	1,0	S
21 4	hVH_3_33	hVL_1-47		1,1	60	S	S	77	0,4	S
21 5	hVH_3_33	hVL_1-51						0	0,6	S
21 6	hVH_3_33	hVL_2-11		0,5	60	S	S	54	0,5	S
21 7	hVH_3_33	hVL_2-14		0,9	4	S	S	53	0,9	S
<u>21</u> <u>8</u>	<u>hVH 3 3</u> <u>3</u>	<u>hVL 2-</u> <u>23</u>	<u>17,1</u>	<u>0,5</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>82</u>	<u>0,5</u>	<u>S</u>

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
219	hVH_3_33	hVL_3-1		0,2	60	S	S	44	0,7	S
220	hVH_3_33	hVL_3-21		0,8	60	S	S	67	0,5	S
221	hVH_3_48	hVK_1_05						0	0,6	S
222	hVH_3_48	hVK_1_06						0	0,7	S
223	hVH_3_48	hVK_1_09						0	0,2	S
224	hVH_3_48	hVK_1_12						0	0,3	S
225	hVH_3_48	hVK_1_16	8,7					15	0,5	S
226	hVH_3_48	hVK_1_17						0	0,5	S
<u>227</u>	<u>hVH 3 4 8</u>	<u>hVK 1 27</u>	<u>8,9</u>	<u>0,7</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>74</u>	<u>0,9</u>	<u>S</u>
228	hVH_3_48	hVK_1_39						0	0,5	S
229	hVH_3_48	hVK_2_30						0	0,3	S
230	hVH_3_48	hVK_3_11						0	0,7	S
231	hVH_3_48	hVK_3_15	12,1					21	0,3	S
232	hVH_3_48	hVK_3_20		0,8	60	S	S	65	0,4	S
233	hVH_3_48	hVL_1-40		0,8		S	S	51	0,6	S
234	hVH_3_48	hVL_1-47	10,3					18	0,4	S
235	hVH_3_48	hVL_1-51		1,2	60	S	S	80	0,7	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
236	hVH_3_48	hVL_2-11						0	0,6	S
237	hVH_3_48	hVL_2-14						0	0,6	S
238	hVH_3_48	hVL_2-23	9,3					16	0,5	S
239	hVH_3_48	hVL_3-1	6,0	0,8		S	S	61	0,5	S
240	hVH_3_48	hVL_3-21						0	0,3	S
241	hVH_3_53	hVK_1_05	11,1	0,7	4	U	S	60	0,8	S
242	hVH_3_53	hVK_1_06		0,7	60	S	S	63	0,7	S
243	hVH_3_53	hVK_1_09	8,3	0,9	60	S	S	83	0,4	S
244	hVH_3_53	hVK_1_12	14,8	0,7	60	S	S	60	0,2	S
245	hVH_3_53	hVK_1_16	10,7	0,0	bg	bg	U	20	0,3	S
246	hVH_3_53	hVK_1_17	2,9	0,5	4	S	S	42	0,5	S
247	hVH_3_53	hVK_1_27	6,9	0,4	60	S	S	62	0,2	S
248	hVH_3_53	hVK_1_39		0,6	60	S	s	56	0,2	S
249	hVH_3_53	hVK_2_30	1,3	0,3	4	S	S	32	0,0	bg
250	hVH_3_53	hVH_3_11		0,8	60	S	S	64	0,3	S
251	hVH_3_53	hVK_3_15	9,6	0,7	60	S	S	63	0,5	S
252	hVH_3_53	hVK_3_20		0,3	4	S	S	32	0,3	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
253	hVH_3_53	hVL_1-40		1,1	4	S	S	60	1,1	S
254	hVH_3_53	hVL_1-47		1,1	60	S	S	79	0,2	S
<u>255</u>	<u>hVH 3 5</u>	<u>hVL 1-51</u>	<u>6,4</u>	<u>1,3</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>96</u>	<u>0,4</u>	<u>S</u>
256	hVH_3_53	hVL_2-11	7,2	0,8	60	S	S	78	0,3	S
257	hVH_3_53	hVL_2-14		1,0	60	S	S	75	0,8	S
<u>258</u>	<u>hVH 3 5</u>	<u>hVL 2-23</u>	<u>6,3</u>	<u>1,1</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>86</u>	<u>0,6</u>	<u>S</u>
<u>259</u>	<u>hVH 3 5</u>	<u>hVL 3-1</u>	<u>5,1</u>	<u>0,6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>67</u>	<u>0,5</u>	<u>S</u>
260	hVH_3_53	hVL_3-21		0,8	60	S	S	66	0,5	S
261	hVH_3_73	hVK_1_05	0,4	0,2	60	S	S	45	1,1	S
262	hVH_3_73	hVK_1_06	0,3	0,2	60	S	S	45	1,0	S
263	hVH_3_73	hVK_1_09	0,3	0,1	60	S	S	39	0,9	S
264	hVH_3_73	hVK_1_12	0,3	0,1	60	S	S	38	0,5	S
265	hVH_3_73	hVK_1_16	0,3	0,2	60	S	S	44	1,1	S
266	hVH_3_73	hVK_1_17	0,1					0	1,0	S
267	hVH_3_73	hVK_1_27	3,6	0,1	4	S	S	24	0,9	S
268	hVH_3_73	hVK_1_39	0,2	0,2	4	S	S	27	0,8	S
269	hVH_3_73	hVK_2_30		0,1	bg	S	S	22	0,3	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
270	hVH_3_73	hVK_3_11	0,5					0	0,2	S
271	hVH_3_73	hVK_3_15	0,2	0,1	60	S	S	39	0,1	S
272	hVH_3_73	hVK_3_20						0	1,1	S
273	hVH_3_73	hVL_1-40		0,1	60	S	S	40	1,2	S
274	hVH_3_73	hVL_1-47	0,0	0,3	4	S	S	31	0,8	s
275	hVH_3_73	hVL_1-51	0,3	0,2	60	S	S	44	0,7	S
276	hVH_3_73	hVL_2-11	0,2	0,2	4	S	S	26	0,8	S
277	hVH_3_73	hVL_2-14						0	0,4	S
278	hVH_3_73	hVL_2-23	0,8					1	0,1	S
279	hVH_3_73	hVL_3-1	0,0	0,1	60	S	S	39	1,0	S
280	hVH_3_73	hVL_3-21	0,4	0,2	60	S	S	43	1,1	S
281	hVH_3_74	hVK_1_05	6,4					11	0,6	S
282	<u>hVH 3 7</u> <u>4</u>	<u>hVK 1</u> <u>06</u>	<u>9,5</u>	<u>0,9</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>86</u>	<u>1,0</u>	<u>S</u>
283	<u>hVH 3 7</u> <u>4</u>	<u>hVK 1</u> <u>09</u>	<u>8,7</u>	<u>0,6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>74</u>	<u>0,5</u>	<u>S</u>
284	hVH_3_74	hVK_1_12	8,4	0,6	60	S	S	74	0,0	S
285	hVH_3_74	hVK_1_16	8,0					11	0,8	S
286	hVH_3_74	hVK_1_17		0,6	60	S	S	58	0,2	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
<u>28</u> <u>7</u>	<u>hVH 3 7</u> <u>4</u>	<u>hVK 1</u> <u>27</u>	<u>5.0</u>	<u>0.6</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>77</u>	<u>1.1</u>	<u>S</u>
28 8	hVH_3_74	hVK_1_39	8,7					15	0,3	S
28 9	hVH_3_74	hVK_2_30		0,4		S	S	37	0,7	S
29 0	hVH_3_74	hVH_3_11						0	0,1	S
<u>29</u> <u>1</u>	<u>hVH 3 7</u> <u>4</u>	<u>hVK 3</u> <u>15</u>	<u>10.0</u>	<u>0.8</u>	<u>70</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>94</u>	<u>1.0</u>	<u>S</u>
29 2	hVH_3_74	hVK_3_20		0,7	60	S	S	62	0,6	S
29 3	hVH_3_74	hVL_1-40	8,8	0,4	4	S	S	51	1,3	S
29 4	hVH_3_74	hVL_1-47	3,2	1,2		S	S	72	0,6	S
<u>29</u> <u>5</u>	<u>hVH 3 7</u> <u>4</u>	<u>hVL 1-</u> <u>51</u>	<u>7.1</u>	<u>1.1</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>91</u>	<u>1.2</u>	<u>S</u>
29 6	hVH_3_74	hVL_2-11		0,6	60	S	S	59	0,8	S
29 7	hVH_3_74	hVL_2-14	4,7					8	0,6	S
29 8	hVH_3_74	hVL_2-23						0	1,0	S
29 9	hVH_3_74	hVL_3-1	7,0	0,6	60	S	S	70	0,3	S
30 0	hVH_3_74	hVL_3-21	1,8	0,6	60	S	S	60	0,3	S
30 1	hVH_4_04 *03	hVK_1_05		0,8	60	S	S	67	0,6	S
30 2	hVH_4_04 *03	hVK_1_06		0,8	60	S	S	64	1,1	S
30 3	hVH_4_04 *03	hVK_1_09	4,5	0,1	bg	S	S	30	0,6	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
304	hVH_4_04*03	hVK_1_12		0,7	60	S	S	61	0,8	S
305	hVH_4_04*03	hVK_1_16	3,2	0,2	60	S	S	48	0,4	S
306	hVH_4_04*03	hVK_1_17		0,4	4	S	S	34	0,8	S
307	hVH_4_04*03	hVK_1_27		0,4	60	S	S	48	0,9	S
308	hVH_4_04*03	hVK_1_39		0,2	bg	S	S	26	1,0	S
309	hVH_4_04*03	hVK_2_30	0,3	0,5	4	S	S	38	0,2	U
310	hVH_4_04*03	hVK_3_11		0,6	bg	S	S	43	0,3	S
311	hVH_4_04*03	hVK_3_15		0,6	60	S	S	58	1,1	S
312	hVH_4_04*03	hVK_3_20		1,1	60	S	U	65	1,1	S
313	hVH_4_04*03	hVL_1-40		1,0	60	S	S	75	0,9	S
314	hVH_4_04*03	hVL_1-47	8,3					14	0,4	S
315	hVH_4_04*03	hVL_1-51		0,9	60	S	S	71	0,6	S
316	hVH_4_04*03	hVL_2-11		1,0	60	S	S	73	0,7	S
317	hVH_4_04*03	hVL_2-14		0,7	60	S	S	63	0,4	S
<u>318</u>	<u>hVH 4 0 4*03</u>	<u>hVL 2-23</u>	<u>2,7</u>	<u>1,0</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>77</u>	<u>0,7</u>	<u>S</u>
<u>319</u>	<u>hVH 4 0 4*03</u>	<u>hVL 3-1</u>	<u>2,2</u>	<u>0,6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>63</u>	<u>1,3</u>	<u>S</u>
<u>320</u>	<u>hVH 4 0 4*03</u>	<u>hVL 3-21</u>	<u>5,2</u>	<u>0,7</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>69</u>	<u>0,5</u>	<u>S</u>

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
32 1	hVH_4_31	hVK_1_05		0,0	bg	S	S	21	0,0	bg
32 2	hVH_4_31	hVK_1_06						0	0,2	bg
32 3	hVH_4_31	hVK_1_09		0,1	4	S	S	23	0,6	S
32 4	hVH_4_31	hVK_1_12		0,1	60	S	S	37	0,4	S
32 5	hVH_4_31	hVK_1_16		0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
32 6	hVH_4_31	hVK_1_17		0,0	bg	U	bg	1	0,2	bg
32 7	hVH_4_31	hVK_1_27		0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
32 8	hVH_4_31	hVK_1_39		0,8	60	S	S	65	0,5	S
32 9	hVH_4_31	hVK_2_30		0,0	bg	S	S	20	0,0	bg
33 0	hVH_4_31	hVH_3_11						0	0,0	bg
33 1	hVH_4_31	hVK_3_15		0,1	bg	S	S	24	0,1	S
33 2	hVH_4_31	hVK_3_20						0	0,4	S
33 3	hVH_4_31	hVL_1-40	0,0	0,6	60	S	S	57	0,8	S
33 4	hVH_4_31	hVL_1-47	0,0	0,7	60	S	S	62	0,1	S
33 5	hVH_4_31	hVL_1-51		0,9	60	S	S	70	0,3	S
33 6	hVH_4_31	hVL_2-11		0,5	60	S	S	55	0,2	S
33 7	hVH_4_31	hVL_2-14	0,0					0	0,5	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
338	hVH_4_31	hVL_2-23		0,0	60	S	S	37	0,3	S
339	hVH_4_31	hVL_3-1	1,4	0,3	60	S	S	50	1,3	S
340	hVH_4_31	hVL_3-21		0,4	60	S	S	50	0,4	bg
341	hVH_4_39	hVK_1_05	0,0	0,3	60	S	S	45	0,3	S
342	hVH_4_39	hVK_1_06	1,6					3	0,8	S
343	hVH_4_39	hVK_1_09		0,5	4	S	S	37	0,7	S
344	hVH_4_39	hVK_1_12						0	0,9	S
345	hVH_4_39	hVK_1_16						0	0,5	S
346	hVH_4_39	hVK_1_17	0,7	0,3	4	S	S	33	1,0	S
347	hVH_4_39	hVK_1_27						0	0,4	S
348	hVH_4_39	hVK_1_39	2,1	0,3	60	S	S	48	1,2	S
349	hVH_4_39	hVK_2_30		0,2	4	S	S	27	0,2	S
350	hVH_4_39	hVK_3_11		0,3	60	S	S	48	0,2	s
351	hVH_4_39	hVK_3_15		0,6	70	S	S	68	1,0	S
352	hVH_4_39	hVK_3_20		0,6	60	S		49	1,2	S
353	hVH_4_39	hVL_1-40	0,6	0,9	70	S	S	81	1,1	S
354	hVH_4_39	hVL_1-47		0,7	70	S	S	72	0,3	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
355	hVH_4_39	hVL_1-51		0,8	60	S	S	65	0,5	S
356	hVH_4_39	hVL_2-11						0	0,3	S
357	hVH 4 3 9	hVL 2- 14	2,0	0,6	60	S	S	63	0,5	S
358	hVH_4_39	hVL_2-23	0,9	0,7	60	S	S	62	0,4	S
359	hVH 4 3 9	hVL 3- 1	3,6	0,5	60	S	S	59	0,9	S
360	hVH_4_39	hVL_3-21		0,6	60	S	S	57	0,6	S
361	hVH_5_51	hVK_1_05		0,5	60	S	S	52	0,4	S
362	hVH_5_51	hVK_1_06		0,5	60	S	S	54	0,9	S
363	hVH 5 5 1	hVK 1 09	2,6	0,5	60	S	S	57	0,5	S
364	hVH_5_51	hVK_1_12	1,8					3	0,8	s
365	hVH_5_51	hVK_1_16	1,3					2	0,5	S
366	hVH_5_51	hVK_1_17		0,3	4	S	S	32	0,6	S
367	hVH_5_51	hVK_1_27	0,4	0,2	60	S	S	43	1,0	S
368	hVH_5_51	hVK_1_39	3,7	0,3	60	S	S	51	1,2	S
369	hVH_5_51	hVK_2_30	0,9	0,2	4	S		19	0,7	S
370	hVH_5_51	hVK_3_11		1,0	60	S		62	0,6	S
371	hVH_5_51	hVK_3_15	1,9					3	1,2	S

ES 2 511 051 T3

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
37 2	hVH_5_51	hVH_3_20						0	1,1	S
37 3	hVH_5_51	hVL_1-40		1,0	60	S	S	72	1,3	S
37 4	hVH_5_51	hVL_1-47		1,0	60	s	S	73	0,8	S
37 5	hVH_5_51	hVL_1-51		1,1	60	S	S	77	0,5	S
37 6	hVH_5_51	hVL_2-11	0,0	0,7	60	S	S	63	0,3	S
37 7	hVH_5_51	hVL_2-14	2,1					4	0,8	S
<u>37</u> <u>8</u>	<u>hVH 5 5</u> <u>1</u>	<u>hVL 2-</u> <u>23</u>	<u>3.0</u>	<u>1.0</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>79</u>	<u>0.7</u>	<u>S</u>
<u>37</u> <u>9</u>	<u>hVH 5 5</u> <u>1</u>	<u>hVL 3-</u> <u>1</u>	<u>3.8</u>	<u>0.7</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>67</u>	<u>1.3</u>	<u>S</u>
38 0	hVH_5_51	hVL_3-21						0	0,7	S
38 1	hVH_6_1	hVK_1_05		0,7	60	S	S	62	0,0	S
<u>38</u> <u>2</u>	<u>hVH 6 1</u>	<u>hVK 1</u> <u>06</u>	<u>3.3</u>	<u>0.6</u>	<u>60</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>64</u>	<u>1.2</u>	<u>S</u>
38 3	hVH_6_1	hVK_1_09	5,9					10	1,3	S
38 4	hVH_6_1	hVK_1_12	1,5	0,0	bg	U	S	13	1,1	S
38 5	hVH_6_1	hVK_1_16						0	1,4	S
38 6	hVH_6_1	hVK_1_17		0,5	60	S	S	54	1,3	S
38 7	hVH_6_1	hVK_1_27		0,5	70	S	S	63	1,2	S
38 8	hVH_6_1	hVK_1_39		0,3	60	S	S	45	1,1	S

Nº	VH	VL	Presentación relativa de Fab (CysDisplay)	Expresión relativa de Fab	Termoestabilidad de Fab	Estabilidad de Fab en suero de ratón	Estabilidad de Fab en suero bovino	Valor de la clasificación de Fab	Expresión relativa de IgG1	Estabilidad de IgG1 en suero bovino
389	hVH_6_1	hVK_2_30		0,3	4	S	S	32	0,3	S
390	hVH_6_1	hVK_3_11						0	0,9	S
391	hVH_6_1	hVK_3_15		0,7	70	S	S	70	1,3	S
392	hVH_6_1	hVK_3_20		0,9	60	S	S	70	1,3	S
393	hVH_6_1	hVL_1-40	7,2					12	1,4	S
394	hVH_6_1	hVL_1-47		1,1	60	S	S	75	0,2	S
395	hVH_6_1	hVL_1-51		1,1	60	S	S	75	0,5	S
396	hVH_6_1	hVL_2-11	1,0	1,0	60	S	S	73	0,2	S
397	hVH_6_1	hVL_2-14						0	0,4	S
398	hVH_6_1	hVL_2-23	2.1	0.8	60	S	S	69	0.4	S
399	hVH_6_1	hVL_3-1		0,5	60	S	S	55	1,4	S
400	hVH_6_1	hVL_3-21	0,4	0,8	60	S	S	66	0,5	S

5 Tal y como se ha descrito en los ejemplos previos, los genes de la línea germinal de VH y VL destacados y las parejas de genes de la línea germinal VH/VL destacadas, se identificaron a partir del repertorio inmune humano y el repertorio inmune humano sin activar, a continuación, las secuencias de proteínas de la línea germinal de VH y VL se analizaron *in silico* para identificar por selección secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que tenían propiedades biofísicas favorables. Como se muestra en la Tabla 21 y las Figuras 37-38, en general, las 20 mejores VH, las 8 mejores VL y las 12 mejores VK se seleccionaron para síntesis, combinación y posterior análisis funcional. Las secuencias de genes de la línea germinal se sintetizaron y luego se combinaron para generar 400 parejas de proteínas de la línea germinal que son representativas de las parejas de genes de la línea germinal abundantes, encontradas en el repertorio inmune, en donde cada una de las regiones variables tiene propiedades biofísicas favorables tal y como se identificó *in silico*. Las 400 parejas de proteínas de la línea germinal VH/VL se sometieron a ensayo para estudiar las siguientes propiedades: a) presentación relativa después de la producción en fagos y ELISA para fagos en formato Fab; b) niveles de expresión relativa de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis de células de *E. coli* y detección con ELISA de Fab producido; c) termoestabilidad de Fab después de la producción de Fab en *E. coli*, lisis de células de *E. coli* y detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de incubar a temperaturas incrementadas; d) estabilidad en suero bovino/ratón

de Fab procedente de lisados de E. coli mediante detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de la incubación en suero bovino/ratón; e) niveles de expresión relativa de IgG1 humana después de la producción de IgG1 en células de mamífero y detección con ELISA de IgG1 secretada a partir de material sobrenadante de cultivos celulares; y f) estabilidad en suero bovino de IgG1 mediante detección con ELISA de Fab no desnaturalizado después de incubación en suero bovino/ratón.

Empleando los datos proporcionados en la Tabla 32, un experto en la técnica podría identificar fácilmente las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen propiedades biofísicas favorables.

En general, las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen un valor umbral en cada propiedad funcional, se seleccionaron para la incorporación en las colecciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden todas las siguientes propiedades, se seleccionaron para incorporarlas en una colección: i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo; ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab; iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C; v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080; y vi) una estabilidad en suero en formato IgG durante catorce días a 37°C. La Tabla 32 muestra en negrita y subrayado las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden todas estas propiedades funcionales.

Tal y como se ha descrito anteriormente, las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen una o varias de las propiedades funcionales se pueden seleccionar para incorporar en colecciones. Para ello, se creó una clasificación combinada de las 400 parejas de proteínas de la línea germinal sometidas a ensayo, de modo que cada pareja de proteínas de la línea germinal se podía clasificar frente a las otras, dando importancia a cada una de las propiedades funcionales sometidas a ensayo. Esto permitió que los inventores seleccionaran una o varias parejas de proteínas de la línea germinal que tenían una o varias o todas las propiedades funcionales enumeradas. En algunas realizaciones, las colecciones comprenden todas las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen las características anteriores. En algunas realizaciones, la colección comprende las parejas de proteínas de la línea germinal que tienen la mayor puntuación combinada de las 400 parejas sometidas a ensayo. En algunas realizaciones, las parejas de proteínas de la línea germinal que tenían puntuaciones combinadas dentro del 10% de las mejores, 20% de las mejores o 30% de las mejores de las 400 parejas sometidas a ensayo, se seleccionaron para incorporar en las colecciones.

REIVINDICACIONES

1. Una colección de anticuerpos sintéticos o de fragmentos funcionales de los mismos, que comprende regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable,

5 en donde dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y dichas regiones estructurales de la cadena ligera variable comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal de una pareja de proteínas de la línea germinal,

en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal comprende las siguientes propiedades:

- i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- 10 ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- 15 v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080 cuyas secuencias de CDR se describen en la Tabla 31;

y

- vi) una estabilidad en suero en formato IgG durante catorce días a 37°C;

en donde dicha colección de anticuerpos o de fragmentos funcionales de los mismos comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de al menos dos parejas de proteínas diferentes de la línea germinal,

20 en donde dicha pareja de proteínas de la línea germinal está codificada por una pareja de genes de la línea germinal,

en donde las parejas de proteínas de la línea germinal se seleccionan a partir de IGHV1-18/IGKV1-05; IGHV1-18/IGLV2-23; IGHV1-46/IGKV1-09; IGHV1-46/IGKV1-39; IGHV1-46/IGKV3-15; IGHV1-69*01/IGKV1-05; IGHV3-07/IGKV1-09; IGHV3-07/IGKV1-12; IGHV3-07/IGKV1-27; IGHV3-07/IGKV3-15; IGHV3-07/IGLV1-47; IGHV3-07/IGLV2-23; IGHV3-07/IGLV3-01; IGHV3-11/IGKV1-05; IGHV3-11/IGKV1-06; IGHV3-11/IGKV1-12; IGHV3-11/IGKV1-16; IGHV3-11/IGKV3-15; IGHV3-11/IGLV1-47; IGHV3-11/IGLV2-23; IGHV3-15/IGKV1-05; IGHV3-15/IGKV1-06; IGHV3-15/IGKV1-09; IGHV3-15/IGKV1-12; IGHV3-15/IGKV1-16; IGHV3-15/IGKV1-27; IGHV3-15/IGKV1-39; IGHV3-15/IGKV3-15; IGHV3-15/IGLV1-40; IGHV3-15/IGLV1-51; IGHV3-15/IGLV2-11; IGHV3-21/IGKV1-06; IGHV3-21/IGKV1-12; IGHV3-21/IGKV1-27; IGHV3-21/IGKV1-39; IGHV3-21/IGLV2-14; IGHV3-21/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV2-23; IGHV3-30/IGLV3-1; IGHV3-33/IGKV3-15; IGHV3-33/IGLV2-23; IGHV3-48/IGKV1-27; IGHV3-53/IGKV1-09; IGHV3-53/IGKV1-12; IGHV3-53/IGLV1-51; IGHV3-53/IGLV2-23; IGHV3-53/IGLV3-1; IGHV3-74/IGKV1-06; IGHV3-74/IGKV1-09; IGHV3-74/IGKV1-27; IGHV3-74/IGKV3-15; IGHV3-74/IGLV1-51; IGHV4-04/IGLV2-23; IGHV4-04/IGLV3-1; IGHV4-04/IGLV3-21; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-1; IGHV5-51/IGKV1-09; IGHV5-51/IGLV2-23; IGHV5-51/IGLV3-1; IGHV6-1/IGKV1-06; y IGHV6-1/IGLV2-23, cuyas secuencias se describen en las Figuras 45 A-C, las Figuras 46 A-C y las Figuras 47 A-B.

2. Una colección según la reivindicación 1, en la que dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable consisten esencialmente en secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden las siguientes propiedades:

- 40 i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA, cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- 45 v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080, cuyas secuencias de CDR se describen en la Tabla 31;

y

- vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

3. Una colección según las reivindicaciones 1 o 2, en la que dichas regiones estructurales de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable consisten en secuencias de proteínas de la línea germinal de las parejas de proteínas de la línea germinal que comprenden las siguientes propiedades:
- 5 i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA, cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A;
- iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- 10 v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080 cuyas secuencias de CDR se describen en la Tabla 31;
- y
- vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.
4. Una colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes a una concentración de al menos 0,05% en el repertorio inmune humano.
- 15 5. Una colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas parejas de genes de la línea germinal están presentes a una concentración de al menos 0,07% en el repertorio inmune humano no activado.
6. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden secuencias humanas.
- 20 7. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha colección de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprende secuencias de proteínas de la línea germinal de al menos diecisiete parejas de proteínas diferentes de la línea germinal.
8. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una o varias regiones determinantes de complementariedad que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal.
- 25 9. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 que comprenden secuencias de proteínas de la línea germinal.
- 30 10. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región FR4 seleccionada a partir del grupo que consiste en: JH4, Jk1 y Jλ2/3.
11. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región HCDR3 diversificada.
- 35 12. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos comprenden una región LCDR3 diversificada.
13. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la colección comprende 1×10^4 anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.
- 40 14. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 60% superior de los Fabs sometidos a ensayo.
15. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,6 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA, cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A.
- 45 16. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas parejas de proteínas de la línea germinal comprenden un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,6 en comparación con MOR03080.
17. La colección según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos fragmentos funciona-

les de dichos anticuerpos se seleccionan a partir del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab', Fv y scFv.

18. Una colección de ácidos nucleicos que codifican la colección según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
19. Una colección de vectores que comprende los ácidos nucleicos según la reivindicación 18.
- 5 20. Una colección de células hospedadoras recombinantes que comprende los ácidos nucleicos según la reivindicación 18 o los vectores según la reivindicación 19.
21. Las células hospedadoras recombinantes según la reivindicación 20, que son procariotas o eucariotas.
22. Las células hospedadoras recombinantes según la reivindicación 21, que son *E. coli* o de mamífero.
- 10 23. Un método para producir la colección de anticuerpos sintéticos o fragmentos funcionales de los mismos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
24. Un método según la reivindicación 23, en el que la etapa de producción comprende además las etapas de
- a) obtener datos que comprenden las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en el repertorio inmune humano;
- b) identificar las parejas de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable que comprenden las siguientes propiedades:
- 15 i) una tasa de presentación relativa en formato Fab que comprende un valor dentro del 75% superior de los Fabs sometidos a ensayo;
- ii) un nivel de expresión en formato Fab de al menos 0,4 en comparación con Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA, cuyas secuencias se describen en la Tabla 5, la Tabla 9, la Figura 45A y la Figura 47A;
- 20 iii) una estabilidad térmica a 60°C o más durante al menos 45 minutos en formato Fab;
- iv) una estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- v) un nivel de expresión en formato IgG de al menos 0,4 en comparación con MOR03080, cuyas secuencias de CDR se describen en la Tabla 31;
- y
- 25 vi) una estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C; y
- c) generar una colección de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprende las secuencias de proteínas de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de las parejas de proteínas de la línea germinal identificadas en la etapa b).
25. Un método según la reivindicación 24, en el que la etapa b) comprende además las etapas de
- 30 ba) identificar las parejas de genes de la línea germinal de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable presentes en una concentración de al menos 0,05% en el repertorio inmune humano;
- bb) generar anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden las parejas de proteínas de la línea germinal identificadas en la etapa ba); y
- bc) evaluar las siguientes propiedades de dichas parejas de proteínas de la línea germinal:
- 35 i) tasa de presentación relativa en formato Fab;
- ii) nivel de expresión en formato Fab;
- iii) estabilidad térmica a 60°C o más en formato Fab;
- iv) estabilidad en suero bovino o de ratón en formato Fab durante más de diez días a 37°C;
- v) nivel de expresión en formato IgG; y
- 40 vi) estabilidad en suero bovino en formato IgG durante catorce días a 37°C.

Figura 1

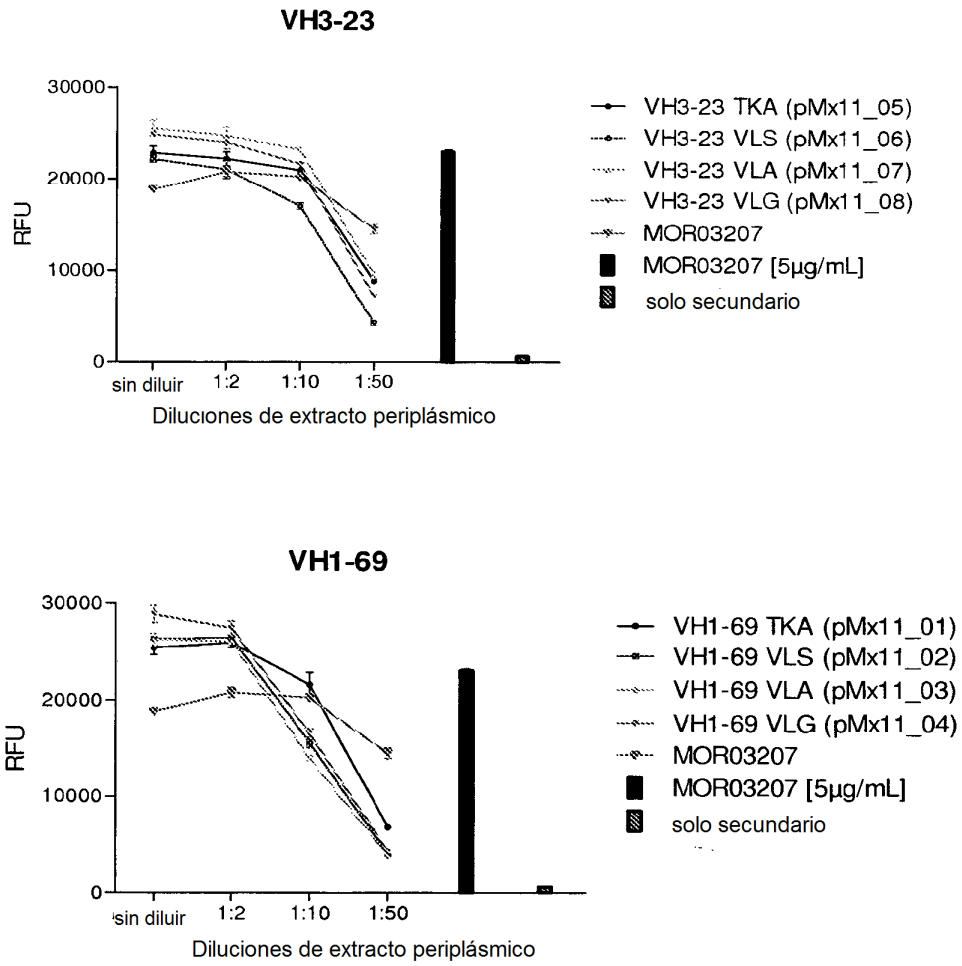


Figura 2

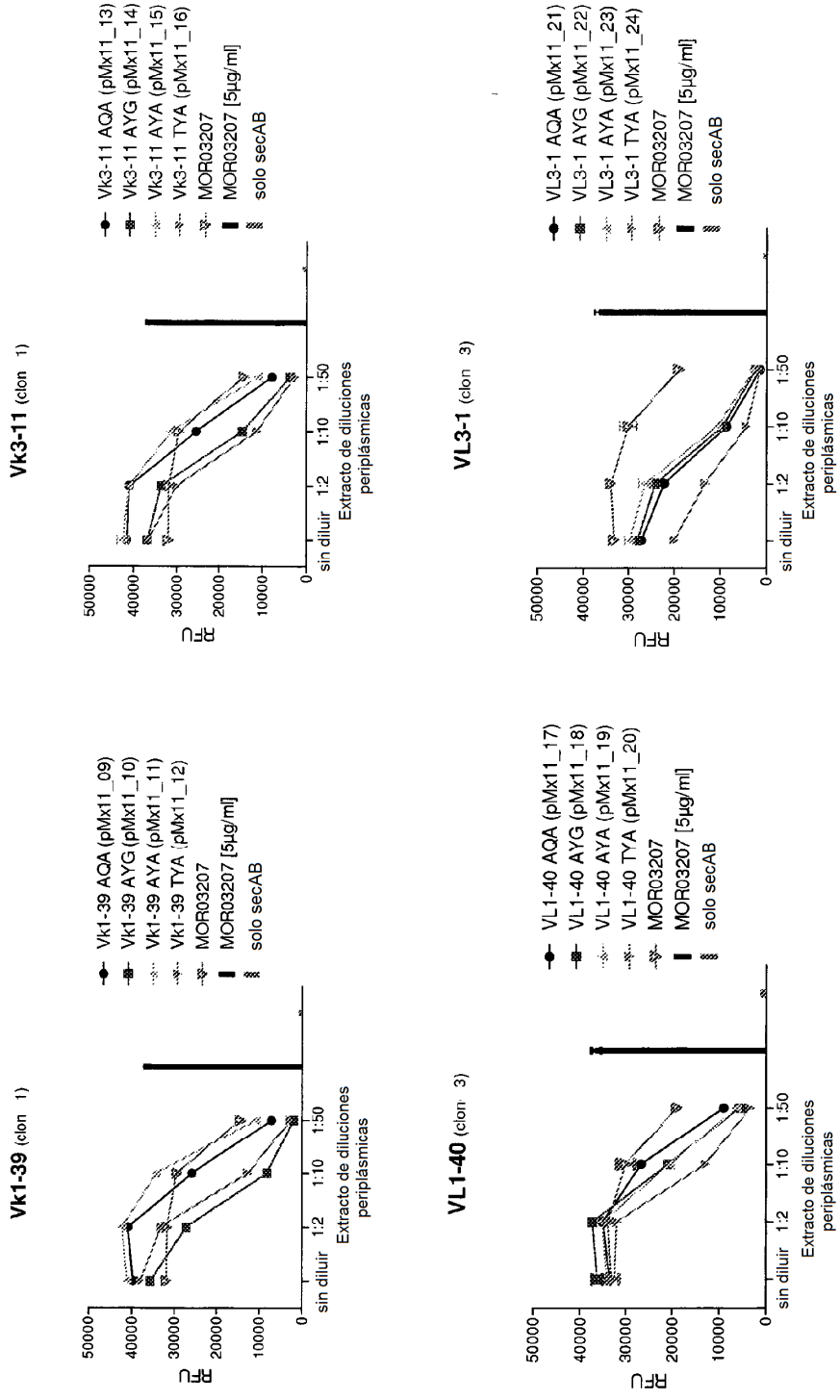


Figura 3

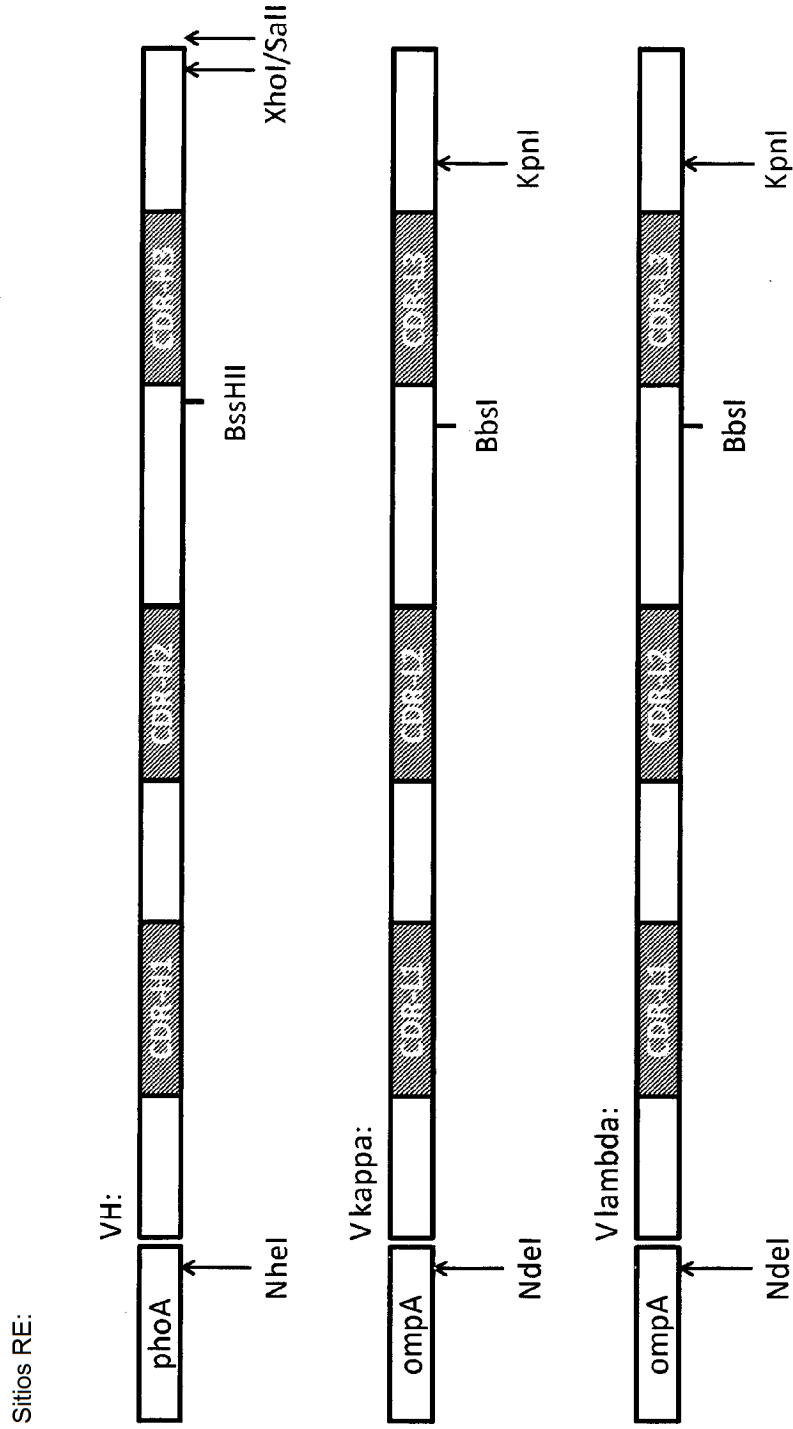


Figura 4

lg	Pesada	Ligera
mm-JB	VH	Vκ
mm-JB1	3-23	3-20
mm-JB4	3-15	3-20
mm-JB14	3-23	4-1
mm-JB15	4-39*	2(D)-28
mm-JB17	4-59	3-15
mm-JB18#	3-23	3-11
mm-JB19	1-2	3-20
mm-JB23#	3-30	4-1
mm-JB28	3-72	1-16
mm-JB29	3-23	3-20
mm-JB37	3-30	2-24
mm-JB38	3-30*	1(D)-8
mm-JB40	3-23	3-20
mm-JB43#	3-53*	1-27
mm-JB50	4-59	4-1
mm-JB52	3-33	3-11
mm-JB56	3-15	3-20
mm-JB57	4-34	1(D)-33
mm-JB60#	5-51	2-30
mm-JB65#	1-24	3-11
mm-JB68#	3-72	1-5
mm-JB70#	3-30*	1-5*
mm-JB73#	3-7	2-30
mm-JB75	3-30	3-11
mm-JB76#	4-59	3-15
mm-JB77#	3-30*	3-15
mm-JB86	3-33	2-24
mm-JB90+l	3-30*	2-30
mm-JB	VH	Vλ
mm-JB13#	3-7*	3-1
mm-JB16	3-11	3-1
mm-JB33	1-3*	2-23
mm-JB48	3-33	1-47*
mm-JB62#	3-15	7-43
mm-JB64	3-15	2-18
mm-JB80	3-72	1-51
mm-JB81#	3-11	2-14
mm-JB82	3-53*	2-14*
mm-JB87	3-11	2-8
mm-JB88	3-30	1-44
mm-JB93	4-39*	2-18*

Figura 5

Ig	Pesada	Ligera
mm-GO	VH	Vk
mm-GO1#	3-30*	1-8
mm-GO12	4-34	1-5
mm-GO14	4-28	1-39
mm-GO15#	3-74	4-1
mm-GO16#	3-21	1-5
mm-GO18	3-21	1-5
mm-GO19#	3-43	3-11
mm-GO26	3-23	1-9*
mm-GO30	4-34	3-15
mm-GO38	4-34	1-5
mm-GO43#	3-23	3-11
mm-GO50	4-39	1-39*
mm-GO68#	3-15	2D28
mm-GO73#	7-81*	4-1
mm-GO75#	3-48	3-20
mm-GO80	3-53*	3-11
mm-GO86	3-30	3(D)-20
mm-GO89#	3-7	1-5
mm-GO93#	3-7*	2-30
mm-5-GO1	3-11	3-15
mm-5-GO2#	3-23	1-5
mm-5-GO14	3-7*	1-5
mm-5-GO20	5-51	1D-39*
mm-5-GO25#	1-3	3-15
mm-5-GO33	3-30*	4-1
mm-5-GO38	3-48	4-1
mm-5-GO39	4-39	1-5
mm-5-GO43	3-53	1-5
mm-5-GO50	4-31*	3-20
mm-5-GO57	5-51	1-5
mm-5-GO65	4-34	1-5
mm-5-GO68#	3-53	3-11
mm-5-GO74	3-23	1(D)-13
mm-5-GO77#	3-23	4-1
mm-5-GO85	4-59	3-20
mm-5-GO86	3-7	3-15
mm-5-GO87	3-30*	1-8
mm-5+GO13#	1-2	1D-39
mm-5+GO18#	1-8	3-15
mm-5+GO26#	1-3	1-6
mm-5+GO43	3-23	3-15
mm-5+GO47#	3-9	3-15
mm-5+GO49#	3-33	3-15
mm-5+GO51#	3-15	4-1
mm-5+GO52#	1-2	3-20
mm-5+GO65#	5-51	1D-39
mm-5+GO66#	3-7	2D-28
mm-5+GO71#	3-23	1-8
mm-5+GO72	3-30	3-20

mm-GO	VH	VI
mm-GO2#	3-23	1-51
mm-GO9	3-7	2-14*
mm-GO61#	4-31*	2-14
mm-GO79	3-11	4-69*
mm-GO85#	3-9	4-60*
mm-GO88#	4-39	2-8
mm-GO90	1-18	1-44
mm-GO91	4-28	1-51
mm-5-GO30	3-11	2-14*
mm-5-GO37	3-11	1-44
mm-5-GO41#	3-48	2-14*
mm-5-GO44	3-74	2-14*
mm-5-GO47	3-48*	2-11
mm-5-GO49	4-31*	2-14*
mm-5-GO61	3-15	7-46*
mm-5-GO64#	3-7	1-47
mm-5-GO84	3-15	1-40
mm-5-GO91	3-23	1-40
mm-5-GO94	3-23	1-36
mm-5+GO3	1-69*	1-44
mm-5+GO25#	4-59	2-14
mm-5+GO27	4-39	2-14*
mm-5+GO39	3-23	1-44
mm-5+GO57	3-23	2-14*

Figura 6

lg	Pesada	Ligera
mm-JH	VH	Vk
mmJH.2 A1	4-59	1-27
mmJH.2 A4#	3-23	1-5*
mmJH.2 A9	4-59	1D-39
mmJH.2 C5	3-23	3-20
mmJH.2 C10#	1-2	1D-39
mmJH.2 C12	3-21	1D-39
mmJH.2 D1	3-23	3-20
mmJH.2 D4	7-81*	1-5*
mmJH.2 D9	3-23	3-15
mmJH.2 D11	3-74	1-5*
mmJH.2 E7	3-11	3-11
mmJH.2 F1	7-81	2D-28
mmJH.2 F7	3-23	3-15
mmJH.2 G3	1-3*	1D-39
mmJH.2 H2	3-23	3-15
mmJH.3 A1	3-74	3-11
mmJH.3 A6	3-23	3-20
mmJH.3 B1#	3-23	4-1
mmJH.3 B2	3-7*	1-5
mmJH.3 B3	3-33	3-11
mmJH.3 B4	3-23	2D-28
mmJH.3 D2	3-21	3-11
mmJH.3 D4	1-18	3-11
mmJH.3 D10	3-72	1-9
mmJH.3 F2	4-59	1D-39
mmJH.3 F3#	3-15	1-9
mmJH.3 G9	3-33	4-1
mm-JH	VH	Vl
mmJH.2 B2	4-31*	1-47*
mmJH.2 B11	4-59	1-44*
mmJH.2 C3	3-9	2-23
mmJH.2 F2	3-23	2-18*
mmJH.2 F3	3-9	2-23
mmJH.2 H3#	3-15	3-1
mmJH.3 A3	7-81*	2-14*
mmJH.3 A5	3-9	2-8
mmJH.3 D1-k	4-4	3-1
mmJH.3 D3	3-7*	3-27
mmJH.3 D9	3-15	7-43
mmJH.3 E10	3-30	2-8
mmJH.3 F1#	3-23	2-14
mmJH.3 F4#	3-7	3-21*
mmJH.3 F9	4-39	1-47*
mmJH.3 G8	3-53	1-44*

Figura 7

Ig	Pesada	Ligera
m-JB	VH	Vk
m-JB 39+l	4-39	3-15
m-JB 49	1-2	3-20
m-JB 63	4-39	3-20
m-JB 74	3-48	3-20
m-JB 77	5-51	1-39
m-JB 86	4-39	3-15
m-JB 87	3-30	1-9
m-JB	VH	VI
m-JB 8	1-69	2-8
m-JB 17	3-30	9-49
m-JB 29	4-39	3-1
m-JB 38	3-48	2-14
m-JB 39+k		3-21
m-JB 64	3-9	1-47
m-JB 85	1-18	2-14
m-JB 88	4-39	2-23

Figura 8

lg	Pesada	Ligera
m-GO	VH	V _K
m-GO4	3-7	2D-28
m-GO6	4-59	3-20
m-GO13	3-43	1-5
m-GO15	3-53	1-5
m-GO21	3-15	1-5
m-GO26	3-48	3-11
m-GO40	4-34	3-20
m-GO43	4-34	3-20
m-GO53	4-39	3-15
m-GO56	3-15	3-20
m-GO64	3-30	1-39
m-GO66	3-48	1-39
m-GO75	1-18	1-33
m-GO79	3-30	1-9
m-GO86	4-34	3-20
m-GO88	3-23	2D-28
m-GO119	3-49	3-20
m-GO126	1-46	1-39
m-GO132	4-59	1-39
m-GO162	1-69	1-39
m-GO166	4-39	3-15
m-GO186	1-46	1-9
m-GO191	3-15	1-39
m-GO193	3-48	3-15
m-GO	VH	V _λ
m-GO3	4-28	1-44
m-GO16	4-34	2-14
m-GO19	3-74	3-21
m-GO28	3-23	3-1
m-GO67	3-48	2-14
m-GO76	1-69	2-14
m-GO77	4-39	1-40
m-GO102	4-28	1-36
m-GO113	1-2	1-40
m-GO115	5-51	1-40
m-GO152	3-9	1-44
m-GO157	5-51	1-36
m-GO163	4-34	2-23
m-GO173	3-43	1-51
m-GO189	1-8	2-14

Figura 9

Ig	Pesada	Ligera
m-JH	VH	Vk
m-JH.1 D4	7-81	3-20
m-JH.1 D12#	4-4	3-15
m-JH.1 E3	4-34	3-20
m-JH.1 F5	3-30	3-15
m-JH.1 F8	3-21	2D-28
m-JH.1 G8	3-48	1D-12
m-JH.1 G10	3-23	3-15
m-JH.1 H5	4-59	3-20
m-JH.1 H11	3-33	2D-28
m-JH.2 A2	3-74	1D-39
m-JH.2 A8	3-7	1-8
m-JH.2 A9	4-31	3-11
m-JH.2 A11	4-61	4-1
m-JH.2 A12#	3-9	1D-8
m-JH.2 B5	7-81	3-20
m-JH.2 C3	3-23	3-20
m-JH.2 C6	3-23	1-9
m-JH.2 C10	4-59	3-15
m-JH.2 D6	3-49	1-17
m-JH.2 D7	3-48	3-15
m-JH.2 E3	1-18	3-20
m-JH.2 E5	4-39	1D-39
m-JH.2 E8	3-9	3-15
m-JH.2 E10#	3-48	3-11
m-JH.2 F3	7-81	3-20
m-JH.2 F9	5-51	3-20
m-JH.2 H12#	3-9	2D-28
m-JH	VH	VI
m-JH.1 B11	3-23	2-14
m-JH.1 C12	4-59	1-40
m-JH.1 D2	1-18	2-8
m-JH.1 D10	4-59	2-14
m-JH.1 F6	1-8	2-14
m-JH.1 H6	3-9	2-11
m-JH.1 H12#	4-34	3-25
m-JH.2 B12	3-23	2-14
m-JH.2 C8#	1-3	2-14
m-JH.2 C12	4-4	2-14
m-JH.2 D8	3-21	6-57
m-JH.2 E6	3-33	2-11
m-JH.2 F6	1-2	2-14
m-JH.2 G12	5-51	2-14
m-JH.2 H4	4-59	1-40
m-JH.2 H12#		2-14

Figura 10

Ig	Pesada	Ligera
gmVB	VH	V _k
VB1	4-59	4-1
VB4	4-39	3-11
VB7#	3-74	3-15
VB10#	4-31*	4-1
VB11#	4-34	2-28
VB23#	4-31*	1-5*
VB26#	3-30	1-13
VB34	3-30	3-20
VB41#	3-15	3-20
VB50	3-11	1-5*
VB52	3-53	1-39
VB54#	3-23	3-20
VB56	3-7*	3-15
VB57	4-31*	3-20
VB58#	4-31*	1-5*
VB60	3-11	3-15
VB65	3-74	1-39
VB68#	5-51	1-5
VB72	3-30	2-28
VB78#	4-31*	3-20
VB83	4-34	1-39
VB86	3-33	1-17
VB92#	1-24	1-39
VB110	4-61	4-1
VB111	3-48	4-1
VB114#	3-74	3-20
VB120#	3-49	1-39
VB121#	3-7*	1-6
VB126	4-39	3D-15
VB129	3-23	1-39
VB132	3-23	1-5*
VB137	3-30	1-5
VB139#	5-51	4-1
VB140	3-21	3-15
VB142	3-33	4-1
VB148	3-33	1-16
VB155	5-51	3-20
VB161	4-61	3-11
VB162	3-48	3-11
VB165	3-30	3-20
VB168	5-51	1-39
VB171#	3-33	3-20
VB174	3-72	1-17
VB176	3-74	3-20
VB179#	3-23	1-17

gmVB	VH	V _k
VB13	5-51	7-43
VB18	1-46	1-51
VB28	3-23	2-11
VB43	1-69*	2-11
VB45	3-21	2-14
VB53	5-51	2-14
VB70	4-59	1-44
VB73#	3-53	7-46*
VB75	3-21	2-14
VB90#	3-21	4-69
VB101	3-23	1-51
VB102	4-31*	2-11
VB107#	5-51	1-47
VB108	3-64	7-43
VB117#	4-28	2-23
VB138	3-7*	7-46*
VB157	3-30	3-1
VB164	3-7*	1-51
VB173	3-21	1-47

Figura 11

lg	Pesada	Ligera
gmPN	VH	V _k
PN1	1-46	3-15
PN2#	3-7	1-5*
PN4	5-51	1-9
PN8	4-59	4-1
PN13	3-43	2-28
PN16	4-4	1-39
PN30	1-46	1-5*
PN33	4-34	3-11
PN40#	3-48	1-16
PN46	4-34	3-20
PN49#	3-48	1-39
PN52	3-23	4-1
PN53#	3-23	3-11
PN54	4-59	1-12
PN56	3-23	3-20
PN60	3-7	3-20
PN64	3-23	3-20
PN73	1-18	1-39
PN75	5-51	3-15
PN76#	4-59	1-27
PN79	1-46	1-5*
PN83#	3-23	3-11
PN84	3-23	1-5*
PN87	4-39	1-5*
PN89	3-74	2-30
PN102	3-7	3-20
PN116	4-34	1-39
PN117#	3-33	1-39
PN119	1-69*	1-5*
PN120#	1-69	1-27
PN123	1-46	3-11
PN138	3-7	1-39
PN140#	1-8	3-20
PN147#	4-59	2D-30
PN148	4-34	2-28
PN156	1-69	2-28
PN157	4-39	3-20
PN158	3-9	1-17
PN162	1-69*	3-11
PN164	1-69*	3-11
PN167	1-69*	1-6
PN169	3-13	1-9
PN171	1-2	3-20
PN175	1-46	1-9
PN182	4-4	1-39
PN184	4-39	1-5
PN187	3-9	3-11
PN189	3-11	1-5*
PN191	3-15	1-13

gmPN	VH	V _k
PN7	3-74	7-46
PN14	4-4	1-40
PN18#	3-23	2-14
PN42	3-7	2-8
PN51	5-51	3-21
PN57	4-34	1-40
PN58	4-31*	7-43
PN67	4-59	1-47
PN69	1-8	2-14
PN88	3-15	1-51
PN107	3-7	1-40
PN115	3-7	1-51
PN131	3-21	3-21
PN134#	1-2	1-40
PN139	3-33	3-21
PN153	3-9	1-40
PN161	3-74	3-21
PN192#	3-21	1-44

Figura 12

Ig	Pesada	Ligera
gmHW	VH	V _K
HW 106#	4-61	4-1
HW 120	4-31	3-15
HW 149	3-21	1-6
HW 154	3-53	3-15
HW 156	3-7	3-15
HW 161	3-74	3-15
HW 168	4-39	3-15
HW 169	1-18	3-15
HW 175	1-18	3-20
HW 209#	4-39	3-15
HW 221	3-74	3-20
HW 224	3-15	4-1
HW 230	3-7	3-15
HW 247	3-9	3-20
HW 266	3-9	1-5*
HW 285	3-33	1D-39
HW 290	3-15	1-5*
HW 307	4-39	1D-39
HW 311	4-59	3-20
HW 326	3-7	1-5*
HW 329	4-34	3-20
HW 337	4-34	3-20
HW 352	1-3*	3-20
HW 376	4-28	3-20
HW 378	1-46	1-27
HW 386#	3-30	1D-39
HW 387	1-46	3-20

gmHW	VH	V _λ
HW 101#	1-18	2-23*
HW 109	3-30	2-11
HW 124	3-7	1-40
HW 157#	3-23	7-43
HW 158	3-11	2-14
HW 174	7-81	2-14*
HW 177	5-51	1-47*
HW 181	1-46	2-14*
HW 182	4-39	2-14*
HW 205	1-69	2-11
HW 225	3-30	1-40
HW 231	3-21	1-51*
HW 237	3-48	1-47*
HW 248	3-21	1-40
HW 251	3-30	1-51
HW 259	1-46	2-11
HW 296	3-21	2-14*
HW 313	3-33	2-23*
HW 327#	3-9	2-14*
HW 330	3-15	1-40
HW 338#	3-21	1-51
HW 345	4-39	1-51*
HW 355	3-73	6-57
HW 357#	3-33	1-51
HW 360	1-46	2-14*

Figura 13

lg	Pesada	Ligera
gm/gp169	VH	V _κ
gm169-3κ	3-48	3-20
gm169-15	1-24	3-11
gm169-16κ	1-8	1-33
gm169-20κ	3-7	4-1
gm169-22κ	3-23	3-15
gm169-24κ	4-4	2-28
gm169-28κ	3-33	1-5
gm169-31κ	3-66	1-39
gm169-34κ#	4-4	1-39
gm169-38κ	3-23	3-15
gm169-42	3-33	1-5
gm169-44	3-48	2-28
gm169-46	4-39	1-39
gm169-57	3-23	1-5
gm169-60	3-43	1-33
gm169-61	4-39	3-20
gm169-64κ	3-7	3-20
gm169-68	4-34	1-5
gm169-70κ	3-13	1-39
gm169-76κ	3-11	2-28
gm169-80κ	4-39	2-28
gm169-86	4-4	1-5
gm169-94	3-30	4-1
gm169-95	1-46	1-39
gp169-8	1-24	3-15
gp169-26κ	3-33	4-1
gp169-29	4-4	3-20
gp169-53κ	4-4	4-1
gp169-64κ	3-30	3-11
gp169-66	4-4	3-20
gp169-81	5-51	2-30
gp169-87	4-39	3-15
gp169-103κ	4-39	4-1
gp169-108	1-2	2-28
gp169-117#	4-59	1-5
gp169-126	3-23	3-15
gp169-127κ	1-69	3-11
gp169-129	5-51	1-12
gp169-144κ	4-4	1-6

gm/gp169	VH	V _λ
gm169-3λ		1-47
gm169-4	3-11	2-23
gm169-8	4-34	1-47
gm169-11	1-2	1-44
gm169-16λ#		2-11
gm169-20λ		3-21
gm169-22λ		3-21
gm169-24λ		9-49
gm169-28λ		2-14
gm169-31λ		3-25
gm169-33#	4-34	2-14
gm169-34λ		1-40
gm169-38λ		3-21
gm169-48	4-4	1-44
gm169-64λ		1-40
gm169-70λ#		1-40
gm169-74	1-46	1-40
gm169-76λ		2-11
gm169-80λ		3-21
gm169-83	3-74	2-11
gm169-85	3-48	1-47
gm169-88	3-30	3-1
gp169-23#	1-58	2-14
gp169-26λ		1-44
gp169-32	4-59	3-21
gp169-43	4-4	1-40
gp169-53λ		2-14
gp169-64λ		6-57
gp169-65	3-30	3-10
gp169-71#	1-18	1-51
gp169-74	3-23	3-1
gp169-77	3-33	6-57
gp169-82#	3-30	1-47
gp169-83	3-23	2-14
gp169-85	3-43	1-36
gp169-86	3-30	3-10
gp169-103λ		6-57
gp169-113	1-69	3-21
gp169-116	3-30	1-40
gp169-122	4-4	2-11
gp169-127λ		1-51
gp169-142	5-51	1-44
gp169-144λ#		2-8
gp169-148#	1-46	6-57

Figura 14

lg	Pesada	Ligera
gm174	VH	Vk
174-2	4-39	2-28
174-5	1-69	3-11
174-8	3-11	1-5
174-9	1-2	4-1
174-12#	1-46	1-27
174-17#	3-23	2-29
174-23	5-51	3-11
174-24#	3-30	3-20
174-28	3-23	1-39
174-32	3-49	1-5
174-35	1-46	3-11
174-55#	1-3	3-15
174-60	5-51	1-39
174-67	3-30	1-6
174-79#	3-30	1-39
174-84	4-34	1-39
174-87	3-48	3-20
174-91#	4-31	1-17
174-117#	4-34	1-39
174-119	3-48	3-20
174-120k	1-24	2-30
174-129	3-30	4-1
174-130	4-31	3-11
174-133	1-69	2-28
174-140	4-59	1-39
174-146#	3-72	3-20
174-148#	5-51	1-33
174-154	4-34	1-5
174-156	4-39	1-5
174-157#	3-53	3-15
174-169#	3-23	1-5
174-176	3-23	4-1
174-177	5-51	3-20
174-179#	4-39	1-39
174-184#	4-39	1-5
174-194#	4-31	2-29
174-196	3-7	2-30

gm174	VH	VI
174-1	1-69	3-10
174-16	4-28	2-23
174-18#	5-51	2-14
174-29	3-15	3-1
174-33	3-21	1-40
174-44	3-33	2-23
174-45	3-53	2-11
174-54	4-59	3-12
174-59	3-33	2-23
174-63	3-74	7-43
174-68	3-7	2-23
174-71	1-46	2-23
174-77	3-15	2-8
174-82	5-51	2-14
174-114	1-18	2-14
174-115#	4-39	2-14
174-118	4-59	1-44
174-120l		2-14
174-125#	7-81	1-40
174-127	3-33	6-57
174-131	4-28	1-51
174-151	3-53	3-1
174-162#	5-51	2-14
174-165	3-53	2-14
174-174	4-39	2-23
174-180	5-51	1-40
174-183#	3-11	1-44

Figura 15

Ig	Pesada	Ligera
gm175	VH	Vk
175-19	3-23	1-5
175-29	5-51	3-15
175-39#	3-43	3-15
175-62	4-61	1-13
175-77	3-23	1-5
175-79	3-73	2-28
175-86#	3-23	3-15
175-90	4-4	1-5
175-95#	4-34	1-39
175-107	3-7	1-5
175-108	1-69	3-11
175-113#	3-33	1-33
175-116	4-34	4-1
175-128	3-23	2-28
175-140	4-59	1D-43
175-150#	1-18	3-15
175-153	3-7	3-11
175-157	3-23	1-9
175-162	3-33	1-5
175-217	1-8	4-1
175-229#	3-30	3-20
175-233	3-15	2-30
175-240	1-2	1-39
175-241	4-31	1-27
175-250	1-2	3-20
175-258#	3-23	1-16
175-260#	3-30	4-1
175-263#	1-8	3-15
175-264	3-33	3-15
175-265	3-23	3-11
175-266	3-15	3-20
175-269	1-3	3-20
175-276	1-24	2-40
175-277	3-21	1-5
175-285#	3-9	2D-29
175-292#	1-69	3-20

gm175	VH	VI
175-23	4-39	2-14
175-42	3-74	2-23
175-80	4-34	2-11
175-82#	1-3	1-40
175-101#	4-39	1-47
175-114#	1-3	2-23
175-142#	4-31	2-23
175-146#	4-34	1-51
175-160	3-23	2-11
175-165	3-23	1-44
175-169	1-8	1-47
175-215	4-28	2-23
175-236#	3-49	3-21
175-238	1-2	1-40
175-242	3-11	2-11
175-248#	7-81	3-21
175-249#	3-33	2-23
175-270#	4-34	1-51
175-280	3-48	2-23
175-282	3-74	3-1
175-286	4-61	2-23
175-289	3-11	2-11
175-295	3-9	2-23

Figura 16

lg	Pesada	Ligera
gm176	VH	Vk
176-10	3-48	1-33
176-62	3-23	3-15
176-66	4-31	1-5
176-91#	3-21	1-5
176-172#	3-21	3-15
176-214	1-69	3-15
176-236#	4-59	3-15
176-256	1-18	3-15
176-267	3-23	3-15
176-270	4-34	3-15
176-301	3-33	2-28
176-337	3-33	2-28
176-435	1-69	3-15
176-514	1-69	1-39
176-534	3-21	3-15
176-548	3-21	1-27
176-585	4-59	3-20
176-592#	4-31	3-11
176-611	3-9	4-1
176-618	1-58	3-11
176-621	4-34	1-9
176-632	4-59	4-1
176-641	3-23	3-15
176-650k	3-9	4-1
176-655	4-39	3-15
176-694	3-48	1-39

gm176	VH	VI
176-29	3-48	2-14
176-130#	4-4	1-44
176-223	4-34	1-40
176-226	1-46	1-51
176-229	3-21	1-44
176-241	3-9	2-14
176-253#	4-39	1-40
176-272	4-39	3-9
176-275	1-8	1-51
176-287#	1-2	1-40
176-290#	4-34	2-14
176-310	3-7	1-47
176-318#	5-51	1-40
176-323	1-69	2-14
176-365	4-31	3-21
176-392	4-4	2-14
176-393#	4-61	2-14
176-395	4-59	3-21
176-428#	1-18	2-14
176-447#	4-59	2-14
176-508#	4-4	2-23
176-523	3-30	1-51
176-535	3-11	2-23
176-536	1-2	2-23
176-540	3-30	1-51
176-558	3-48	1-47
176-614	4-39	1-44
176-616	3-9	1-44
176-620	3-9	2-8
176-627	3-30	1-44
176-650l#		4-69
176-662#	3-30	1-51

Figura 17

lg	Pesada	Ligera
gmJH	VH	V _k
JH1	1-18	3-20
JH5	3-30	3-20
JH17	4-34	3-11
JH19#	4-59	3-20
JH20	3-33	3-15
JH22#	1-24	1-39
JH23#	1-18	3-20
JH-26#	5-51	3-20
JH35	3-21	1-6
JH38	3-7	1-39
JH39#	3-30	1-39
JH40#	4-31	3-20
JH55	3-30	3-20
JH56#	1-8	3-20
JH57	4-59	1-39
JH60	3-23	3-20
JH65	1-18	1-39
JH66	3-48	1-39
JH69	3-7	4-1
JH76#	4-31	1-39
JH78#	1-8	3-15
JH81#	7-4	1-39
JH82#	3-48	1-9
JH96	3-30	3-15
JH101#	1-69	3-20
JH103	4-31	2-28
JH113	3-33	1-5
JH114#	1-46	3-20
JH117#	3-23	3-20
JH124#	4-39	1-39
JH125#	3-9	1-12
JH129	1-18	1-33
JH131#	3-7	1-5
JH132	4-39	1-39
JH135	1-18	1-39
JH147#	3-30	3-20
JH148	3-23	1-5
JH154	3-33	3-15
JH156	3-7	1-27
JH160#	3-21	3-20
JH162	3-15	1-33
JH165	3-7	4-1
JH167#	4-59	3-20
JH179	3-23	4-1
JH183#	3-11	3-20
JH186	1-2	1-39
JH188	3-30	1-17
JH192	3-48	3-15
JH194	7-4	1-5
JH195	4-34	3-20

gmJH	VH	V _λ
JH16	4-39	1-47
JH21	3-15	1-44
JH28#	3-74	2-23
JH42	7-4	1-51
JH48#	5-51	1-40
JH50	4-31	2-23
JH59#	1-2	1-44
JH63	4-34	1-47
JH75	4-34	3-21
JH79	4-31	2-14
JH88	3-66	1-44
JH91	3-21	2-8
JH93	4-39	3-1
JH95	4-59	1-47
JH105#	4-4	2-8
JH107#	3-23	2-14
JH109#	5-51	2-14
JH128	4-59	6-57
JH143#	5-51	2-23
JH171	4-39	2-23
JH185#	4-59	2-14

Figura 18

S3 preB		S4 ei		S5 imm	
VH	Vk	VH	Vk	VH	Vk
3-9	1-16	3-23	4-1	3-48	1-8
3-30	2D-30	3-23	1-8	3-15	1-9
3-48	1-33	4-34	1-16	4-39	1-39
4-59	1D-17	3-33	1-39	3-7	1-8
3-30	1D-8	3-30	3-20	3-33	1-5
1-2	1-5	4-34	2D-28	1-18	1-5
1-2	1-6	3-74	4-1	3-15	1-9
3-15	1D-43	VH	VL	3-23	1-8
3-30	2-30	3-21	1-47	4-34	1-39
3-30	3-11	3-23	1-36	3-30	1-39
3-11	1-6	3-48	3-25	3-15	1-39
4-59	2-30	4-39	1-44	7-81	1-39
3-30	3-20	1-69	3-1	3-15	1-33
1-3	2-30	4-59	1-40	3-23	3-15
VH	VL	4-34	1-44	4-39	3-11
3-21	1-51			4-34	3-15
3-21	7-46			3-11	1D-8
3-53	1-47			1-2	3-20
1-2	3-27			4-31	3-15
1-69	1-44			3-21	1-39
3-21	2-23			3-33	1-9
				3-15	1-5
				4-39	1-5
				1-69	4-1
				1-58	4-1
				VH	VL
				1-46	1-44
				3-11	4-69
				3-23	3-19
				1-18	2-11
				4-61	7-43
				5-51	2-14
				3-15	1-44
				3-11	3-1
				3-15	3-25
				5-51	2-14
				1-69	1-51
				1-18	2-14
				3-23	3-1

Figura 19

S6 imm		S7 ne		S8 ne	
VH	Vk	VH	Vk	VH	Vk
1-18	2-40	3-53	1-39	3-13	1-39
4-59	3-20	1-69	1-33	3-7	3-11
3-21	1-5	3-21	3-15	1-46	3-15
1-2	1-5	5-51	2D-28	3-48	3-11
1-18	1-33	3-13	1-5	3-48	3-20
4-34	1-39	1-69	1-8	1-46	1-33
1-8	2D-28	3-30	1-27	3-49	1-5
4-34	3-20	4-34	1-27	1-3	1-39
4-34	1-39	3-30	1-9	1-18	3-20
1-2	1-39	1-69	1-39	4-59	1-5
3-30	2-24	3-15	1-5	4-39	3-11
3-15	3-20	4-49	3-20	3-23	1-5
1-24	2-24	3-21	2D-28	4-39	1-33
1-3	1-39	4-39	3-15	1-69	3D-15
3-30	3-20	3-15	1-39	3-33	1-9
4-4	1D-8	3-74	3-20	1-3	3-15
3-21	3-15	3-30	2D-28	1-46	1-8
4-39	3-20	3-30	1-6	3-7	1-39
4-59	1-27	3-23	3D-20	5-51	1-5
3-9	1-8	3-30	3-11	3-33	3-15
3-7	3-15	VH	VL	4-34	1-39
3-33	sD-28	5-51	1-40	3-53	1D-16
1-69	1-39	3-7	1-51	1-18	3-20
3-30	1-5	3-9	2-14	1-2	3-20
1-18	3-11	4-59	1-44	3-7	1-13
3-15	3-20	4-49	2-14	VH	VL
3-21	1-5	1-69	1-40	1-18	3-10
1-2	1-8	4-39	1-51	1-2	3-1
3-74	3-15	4-31	2-14	3-30	3-1
4-4	4-1	3-9	2-14	1-3	3-1
VH	VL	5-51	1-44	3-30	1-51
4-34	1-47	3-49	1-40	3-7	1-40
5-51	1-40	4-39	2-14	5-51	3-21
4-61	2-11	5-51	1-44	1-46	1-44
3-30	2-23			3-21	2-14
3-15	2-23			1-2	1-40
4-31	1-44			4-59	2-11
3-13	1-47			4-34	2-14
4-39	1-44			3-48	2-14
5-51	2-14			1-2	2-14
3-33	1-40			3-48	1-51
3-30	1-51			3-48	3-1
4-34	1-51				
3-21	3-1				
3-30	2-14				
4-31	3-21				

Figura 20

S9 mn	
VH	Vk
4-39	3-15
3-7	2D-28
4-59	3-20
3-43	1-5
3-53	1-5
3-15	1-5
1-24	1-39
3-48	3-11
4-39	3-15
4-34	3-20
4-34	3-20
3-43	1-5
4-39	3-15
3-15	3-20
1-3	1-39
3-30	1-39
3-48	1-39
3-48	1-9
1-69	2-30
1-18	1-33
3-30	1-9
3-21	3-11
4-34	3-20
3-23	2D-28
1-24	3-11
3-49	3-20
5-51	2D-28
1-46	1-39
4-59	1-39
1-69	1-39
3-15	1-33
4-34	3-15
3-48	1-39
1-69	1-39
4-39	3-15
3-74	1D-37
3-23	1-39
1-46	1-9
3-23	3-15
3-15	1-39
3-48	3-15

VH	VL
1-24	1-44
4-28	1-44
4-34	2-14
3-74	3-21
5-51	3-21
3-23	3-1
3-15	1-44
4-39	2-14
3-48	2-14
1-69	2-14
4-39	1-40
5-51	3-25
3-64	3-21
4-28	1-36
4-59	3-1
1-2	1-40
5-51	1-40
3-7	3-21
1-69	1-51
3-9	2-14
3-9	1-44
3-33	2-14
5-51	1-36
4-34	2-23
3-30	3-21
1-69	1-40
3-43	1-51
3-11	1-47
4-34	2-8
1-8	2-14

S10 mn	
VH	Vk
1-2	4-1
4-34	3-20
1-18	3-20
3-30	1-39
4-39	1-39
4-59	4-1
4-39	3-15
4-39	3-20
1-24	2-30
1-2	3-20
3-9	1-16
4-59	3-20
4-31	2-28
4-59	1-16
4-39	3-20
3-53	1-17
3-48	3-11
3-48	3-20
4-59	3-20
5-51	1-39
3-9	1-5
4-39	3-15
3-30	1-9
4-34	1-39
VH	VL
1-69	2-8
5-51	1-44
3-30	9-49
5-51	1-44
4-39	3-1
1-69	3-25
4-59	2-23
3-48	2-14
3-21	1-51
5-51	1-40
4-31	4-69
1-69	1-40
1-46	1-47
3-9	1-47
1-18	2-14
4-39	2-23
1-2	3-1

Figura 21

S1 ne		S2 mn	
VH	Vk	VH	Vk
3-23	3-20	3-7	4-1
4-59	1-33	3-73	1-9
1-18	3-20	1-18	1-5
3-48	1-33	3-23	3-15
4-34	3-20	5-51	4-1
3-23	4-1	3-23	1-12
4-4	2D-29	3-9	1-39
3-11	1-5	3-33	4-1
3-53	1-5	3-53	1-12
3-9	1-39	4-39	3-20
3-7	1-27	3-23	3-20
3-48	4-1	3-72	3-15
5-51	4-1	3-48	1-33
3-30	3-20	5-51	3-15
3-53	3-20	5-51	4-1
3-30	1-39	5-51	3-20
3-30	4-1	1-2	3-15
3-7	1-5	3-21	4-1
7-81	1-39	3-11	1-39
3-9	4-1	1-2	3-20
5-51	3-15	3-48	4-1
3-23	4-1	4-39	1-5
1-2	1-39	4-39	1-39
4-59	3-20	1-2	1-27
4-34	4-1	4-31	1-39
3-33	1-8	4-59	1-39
3-48	1-33	4-39	1-33
5-51	3-15	4-39	1-6
3-15	2D-28	3-48	4-1
1-18	1-39	3-23	4-1
1-3	1-33	3-7	3-15
4-59	4-1	3-53	4-1
4-39	1-33	3-7	3-20
3-15	3-11	VH	VL
1-18	2-30	4-39	1-44
4-39	4-1	1-2	1-44
3-48	3D-20	1-69	2-8
VH	VL	4-59	3-1
3.23	2-8	4-39	2-8
4-39	2-14	3-23	1-40
3-23	3-21	4-31	1-51
3-33	3-27	4-34	1-51
5-51	1-40	3-49	2-14
7-81	3-21	4-31	1-47
4-4	1-44	1-18	1-40
1-2	2-14	4-31	2-14
4-4	1-44	4-39	1-51
		4-39	2-14
		3-48	7-46

Figura 22

S3 ne		VH	VL
VH	Vk	VH	VL
3-30	4-1	1-18	1-36
3-49	1-17	3-43	2-14
3-23	1-8	5-51	1-40
3-30	3-15	5-51	1-40
3-64	3-15	4-39	1-51
1-18	3-11	3-23	2-14
3-48	1-5	3-43	3-1
1-24	1-33	4-59	1-40
3-30	1-5	3-7	2-14
1-69	4-1	3-7	1-47
1-8	3-11	1-18	1-40
3-9	2D-29	4-61	3-1
1-18	2-28	3-30	1-44
3-30	3-15	4-61	2-14
3-23	4-1	3-33	2-14
1-8	3-15	1-18	1-40
4-39	1-5	4-59	1-40
4-31	1-6	1-24	2-11
3-23	1-5	5-51	1-47
3-33	3-20	4-34	2-14
3-53	1-8	1-8	9-49
3-53	1-8		
3-7	1D-8		
4-39	1-39		
3-30	1-9		
5-51	4-1		
3-53	1-5		
4-39	1-5		
4-34	3-20		
1-69	1-5		
4-59	3-20		
3-7	1-17		
3-21	1-8		
3-23	1-5		
3-30	1-33		
3-30	1-5		
4-31	3-11		
1-2	1-5		
4-61	3-15		
3-30	1-39		
3-48	3-15		
3-7	1-8		
3-23	1-5		

Figura 23

S4 mn		S5 ne		S6 mn	
VH	Vk	VH	Vk	VH	Vk
3-30	3-11	4-34	1-39	3-13	4-1
4-34	3-11	3-23	3-15	4-34	4-1
3-30	1-5	3-23	3-20	3-15	4-1
1-58	1-5	4-61	1-39	1-18	2-28
3-21	3-15	3-64	3-11	1-69	1-16
4-39	2-30	3-15	3-15	3-23	4-1
3-23	1-33	3-53	2-28	3-23	1-5
3-7	1-9	1-18	3-11	3-30	3-15
3-30	3-11	3-49	1-39	3-48	1-17
3-23	3-20	3-64	2D-29	3-23	1-33
4-34	1-5	3-21	3-15	3-23	1-16
4-34	1-17	4-59	1-33	3-53	3-15
3-53	1-33	3-53	3-11	3-48	2-28
3-21	3-20	3-23	3-15	3-7	1-9
4-31	1-33	3-9	1-27	3-30	3-11
4-34	1-39	3-13	2-30	3-30	4-1
1-18	3-20	4-4	3-11	3-43	3-11
3-53	1-5	3-33	3-20	1-18	2-28
4-61	1-39	5-51	2-28	3-30	4-1
3-21	1-39	3-7	3-20	5-51	3-11
5-51	1-27	3-23	2-40	3-23	2-28
5-51	4-1	4-31	1-39	1-2	3-15
3-30	2D-29	3-23	1-16	3-11	3-20
3-53	1-5	3-48	2-28	4-31	3-11
3-23	1-39	4-31	1-33	1-24	2D-28
5-51	4-1	4-31	1-27	1-46	3-20
3-11	3-20	3-48	3-20	5-51	1-17
VH	VL	3-53	4-1	1-58	3-20
4-59	1-51	4-4	2D-29	4-59	3-20
3-23	2-14	4-31	4-1	3-21	1-5
3-15	2-8	4-34	2-28	1-8	4-1
3-11	3-1	4-34	3-15	3-53	4-1
4-28	2-23	1-69	3-20	3-23	1-39
4-34	1-44	3-15	1-27	3-64	1-5
4-59	3-1	1-24	3-15	4-4	3-15
3-30	1-51	1-2	2D-26	1-46	4-1
3-30	3-27	VH	VL	VH	VL
4-39	2-18	1-3	3-1	3-64	2-14
5-51	1-40	1-69	2-11	3-23	1-40
5-51	1-47	3-33	3-9	3-74	2-8
4-39	2-8	4-31	1-51	4-34	1-40
3-33	1-47	4-59	3-1	5-51	2-14
		1-46	1-44	3-21	1-51
		4-4	2-23	3-11	1-51
		4-39	2-8	1-8	1-47
		1-3	2-14	3-48	1-19
		3-15	1-47	1-69	2-14
		3-48	3-21	3-23	2-11
		3-21	2-14	3-23	1-40
		3-11	3-21		
		3-30	2-14		

Figura 24

S1 mn		S2 mn		VH		VL	
VH	Vk	VH	Vk	VH	VL		
4-4	3-11	3-7	3-11	5-51	2-23		
1-18	3-20	3-23	3-11	1-46	1-51		
3-74	2-30	4-4	4-1	3-48	3-1		
5-51	3-11	4-59	1-12	3-30	1-40		
3-30	1-5	4-39	1-5	1-46	1-51		
3-21	3-20	1-3	1-5	3-30	1-40		
3-23	2D-40	5-51	4-1	4-31	1-40		
4-39	3-20	4-34	4-1	4-59	1-47		
4-31	3-20	4-34	3-20	4-31	3-1		
3-15	3-15	4-39	3-11	3-9	2-23		
4-39	3-15	3-33	3-15	4-34	1-40		
4-4	3-20	3-15	1-39	3-9	2-14		
1-18	1-5	1-18	4-1	3-9	2-11		
4-39	3-20	4-34	3-15	4-39	2-8		
4-59	1D-39	4-31	3-15	1-18	1-51		
3-30	3-20	1-2	1-33	4-59	1-51		
3-33	1D-39	4-39	1-5	4-31	2-14		
4-34	1-5	4-34	1-39	4-61	1-44		
3-21	3-20	4-39	1-5	4-31	1-40		
1-8	1-9	3-74	1-5	3-9	1-44		
4-34	3-20	4-39	3-20	3-30	1-51		
4-4	3-11	1-18	3-20	3-11	9-49		
1-46	3-20	4-34	3-20	4-4	1-51		
1-18	1-8	4-39	1-5	1-18	3-25		
4-39	1-39	3-7	1D-17				
4-59	1-8	5-51	2-28				
3-7	3-15	3-53	1-27				
3-53	1D-39	1-69	1D-16				
VH	VL	4-34	3-11				
3-33	1-47	3-53	1-39				
3-30	3-21	1-69	1-5				
4-59	1-51	4-31	3-20				
3-15	6-57	4-31	1-33				
4-39	2-14	3-15	3-20				
3-73	1-51	3-48	3-20				
5-51	3-25	5-51	1-5				
3-53	1-51	4-59	3-11				
3-48	3-1	3-30	1-39				
4-39	7-46	3-11	1-39				
4-39	6-57	3-33	3-15				
1-18	1-40	4-59	3-11				
4-34	2-8	4-34	3-11				
5-51	1-40	3-30	1-5				
4-39	2-8	4-39	1-27				
4-39	1-40	3-30	3-11				
4-39	2-8	4-34	2-28				
1-18	2-8	3-33	3-20				
		3-30	3-11				
		4-34	3-15				
		4-39	1-39				
		3-48	1-27				
		4-34	3-20				
		4-4	3-20				

Figura 25

S3 mn				S4 mn			
VH	Vk	VH	VL	VH	Vk	VH	VL
3-23	3-20	3-15	1-44	1-69	1D-39	3-21	2-11
1-46	1-16	3-23	2-23	3-23	3-15	1-69	2-8
3-30	1-5	4-4	1-44	4-4	3-20	4-34	2-14
3-33	1D-33	3-15	3-21	3-21	1-27	1-24	2-23
3-7	1D-39	1-2	2-8	3-23	1-17	3-23	1-40
1-69	1D-39	3-30	2-11	1-18	1D-39	4-34	1-40
4-34	3-20	4-31	2-23	3-23	3-20	3-48	1-44
3-74	3-11	3-49	2-28	4-4	1D-39	3-48	1-47
3-15	1D-33	1-18	6-57	1-46	1D-39	3-73	1-47
1-3	2D-29	3-11	1-44	3-7	1D-39	4-4	2-14
1-18	1D-33	1-69	2-11	4-34	3-20	3-23	1-40
1-46	1-16	4-39	2-23	3-30	1-16		
3-23	1-5	1-2	2-8	1-69	2D-28		
4-39	3-20	3-49	3-21	1-69	3-20		
3-30	3-11	4-34	2-8	3-53	1D-33		
3-11	2D-28	3-9	2-11	1-69	1D-39		
3-7	4-1			4-31	3-11		
3-23	1-5			3-21	1D-39		
3-15	1-5			4-39	1-27		
3-72	3-15			1-18	3-20		
3-11	3-11			1-24	3-20		
3-21	2D-29			3-23	3-20		
3-23	1-5			3-23	1-27		
1-69	3-20			3-30	3-15		
1-69	1D-39			1-2	2D-28		
1-69	3-20			4-61	3-15		
3-11	1-16			3-15	1D-39		
3-23	1-27			3-7	1D-39		
4-34	2D-28			1-18	1D-39		
3-53	1-9			3-23	3-11		
1-69	2D-30			1-18	1D-39		
1-8	2-29			3-23	2D-28		
3-7	3-15			1-2	1-27		
3-53	1-5			3-53	3-15		
3-23	1D-33			4-34	1-17		
3-48	1D-33			3-15	1D-39		
3-15	3-11			3-53	1D-39		
4-31	2D-28			3-30	2D-28		
3-23	1D-39			3-11	1D-39		
3-23	2D-28			3-23	3-20		
4-61	1-16			3-23	3-15		
3-30	1D-39						
4-34	3-15						
3-33	4-1						
3-21	1-5						
3-49	3-15						
5-51	3-20						
4-31	1-17						
4-34	1D-39						
1-18	2D-28						
3-53	1D-33						
5-51	3-20						
5-51	3-20						
3-53	2-29						

Figura 26

S5 mn				S6 mn			
VH	Vk	VH	VL	VH	Vk	VH	VL
4-39	1D-39	1-69	2-14	1-18	3-20	1-8	2-8
4-34	3-20	3-15	3-22	4-59	1D-39	4-34	1-51
3-21	3-15	5-51	1-40	3-53	3-11	3-11	8-61
3-48	3-20	4-34	1-51	4-4	1-5	1-18	6-57
3-15	3-20	3-23	1-51	3-53	1D-33	4-34	2-14
4-59	1-39	1-2	2-11	3-9	1D-39	4-34	1-47
4-4	3-20	4-59	1-51	5-51	1D-39	1-2	2-14
4-39	1-17	3-49	2-8	3-11	1-9	3-21	4-69
3-49	1-39	1-18	1-44	3-7	3-11	3-74	1-47
4-4	1-5	1-69	1-40	1-18	4-1		
4-34	4-1	3-66	1-47	3-48	1-6		
4-34	1-9	3-48	2-11	4-59	1D-39		
3-15	3-11	4-31	2-14	3-53	4-1		
4-34	1-39	4-28	2-14	3-30	4-1		
3-48	3-11	1-2	2-14	4-59	4-1		
3-30	3-20	3-73	1-40	3-30	1-5		
3-20	1-39	3-48	1-47	4-59	1D-39		
3-48	1-16	4-34	2-14	3-7	2-30		
3-30	1-39	3-23	2-23	4-59	1D-39		
1-69	3-20	1-24	2-23	3-53	3-15		
4-39	3-15			3-23	1-27		
4-31	2-40			4-34	1D-39		
3-33	3-20			1-2	1D-39		
4-59	4-1			3-23	2-29		
4-34	1-39			3-13	1D-33		
4-59	3-11			4-59	3-20		
3-11	3-15			3-21	4-1		
1-18	1-5			3-7	3-20		
3-7	1-39			3-21	3-15		
4-34	4-1			1-8	1D-39		
				3-66	1D-39		
				3-23	3-20		
				3-21	1-8		
				3-13	1D-39		
				3-23	1-27		
				3-23	1-17		
				3-21	1D-39		
				1-18	2-28		
				4-34	1-5		
				4-54	3-11		
				3-49	1D-39		
				4-39	1D-39		
				3-48	2D-29		
				3-21	1D-39		
				3-64	1-9		
				3-23	3-20		
				3-53	3-20		
				4-34	3-20		
				3-23	1-17		
				4-4	1-27		
				4-34	1D-33		
				3-48	1-8		
				1-24	4-1		
				4-4	2-28		

Figura 27

RT (hexámeros aleatorios): genoteca de ADNc de células aisladas

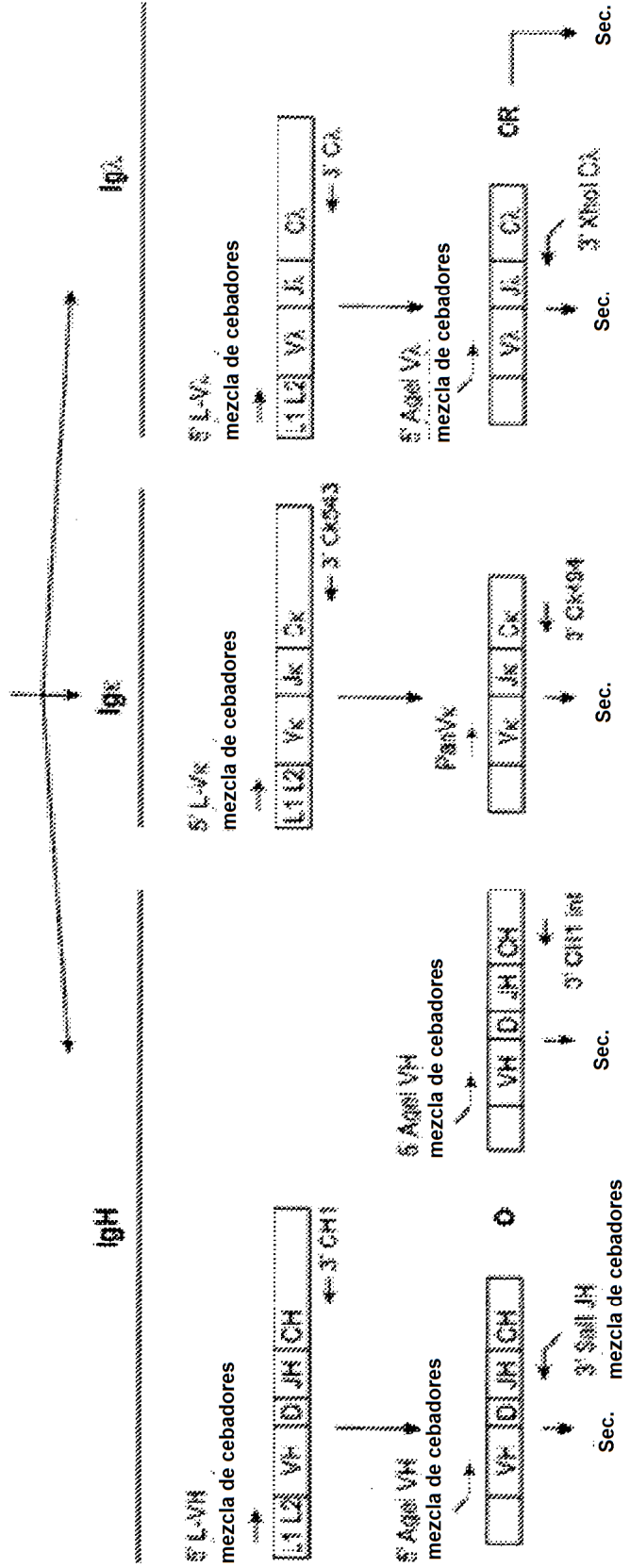


Figura 28

	VH	Vk	VI
ascTT_201	1-02*02		1-44*01
ascTT_65	1-02*02		1-51*01
ascTT_153	1-02*02		2-14*04
ascTT_316	1-02*02		7-46*01
ascTT_294	1-02*04		2-14*03
ascTT_307	1-08*01	1-05*03	
ascTT_350	1-18*01	1-17*01	
ascTT_06	1-18*01	3-20*01	
ascTT_207	1-18*01		1-51*01
ascTT_164	1-58*01	3-20*01	
ascTT_395	1-69*01	3-15*01	
ascTT_138	1-69*01	3-20*01	
ascTT_214	1-69*01	4-01*01	
ascTT_51	1-69*01		1-44*01
ascTT_176	1-69*01		1-44*01
ascTT_212	1-69*01		1-44*01
ascTT_258	1-69*01		1-44*01
ascTT_327	1-69*01		1-44*01
ascTT_08	1-69*01		2-11*01
ascTT_310	1-69*06	1-27*01	
ascTT_255	1-69*06	1-39*01	
ascTT_178	1-69*06	3-11*01	
ascTT_79	1-69*06	3-15*01	
ascTT_334	1-69*06	3-15*01	
ascTT_105	1-69*06	3D-15*01	
ascTT_61	1-69*06	4-01*01	
ascTT_231	1-69*06	4-01*01	
ascTT_265	1-69*06		1-47*01
ascTT_179	1-69*06		6-57*01
ascTT_101	3-07*01	1-05*03	
ascTT_42	3-07*01		1-44*01
ascTT_195	3-07*01		1-44*01
ascTT_390	3-09*01		1-51*01
ascTT_182	3-09*01		
ascTT_188	3-09*01		
ascTT_225	3-09*01		
ascTT_319	3-11*01	1-12*01	
ascTT_29	3-11*01		1-40*01
ascTT_385	3-11*01		7-46*01
ascTT_87	3-11*03	1-39*01	
ascTT_349	3-20*01		2-14*03
ascTT_156	3-21*01		1-51*01
ascTT_344	3-21*01		3-21*01

Figura 29

	VH	Vk	VI
ascTT_31	3-23*01	1-05*03	
ascTT_45	3-23*01	1-05*03	
ascTT_59	3-23*01	1-05*03	
ascTT_78	3-23*01	1-05*03	
ascTT_88	3-23*01	1-05*03	
ascTT_148	3-23*01	1-05*03	
ascTT_292	3-23*01	1-05*03	
ascTT_320	3-23*01	1-05*03	
ascTT_348	3-23*01	1-05*03	
ascTT_358	3-23*01	1-39*01	
ascTT_365	3-23*01	1-39*01	
ascTT_158	3-23*01	3-20*01	
ascTT_204	3-23*01		1-44*01
ascTT_245	3-23*01		1-44*01
ascTT_275	3-23*01		1-44*01
ascTT_56	3-23*01		2-14*04
ascTT_278	3-23*01		2-23*01
ascTT_21	3-30*18	1-09*01	
ascTT_335	3-30*18	3-11*01	
ascTT_159	3-30*18	3-15*01	
ascTT_274	3-30*18	3-15*01	
ascTT_109	3-30*18		1-40*01
ascTT_27	3-30*18		2-14*01
ascTT_394	3-30*18		3-21*03
ascTT_193	3-33*01	3-15*01	
ascTT_144	3-33*05		4-69*02
ascTT_162	3-43*01		2-11*01
ascTT_124	3-43*01		9-49*01
ascTT_57	3-48*01	3-20*01	
ascTT_77	3-48*01	3-20*01	
ascTT_01	3-53*01		1-44*01
ascTT_28	3-53*01		1-44*01
ascTT_36	3-53*01		1-44*01
ascTT_141	3-53*01		1-44*01
ascTT_229	3-53*01		1-44*01
ascTT_304	3-53*01		1-44*01
ascTT_341	3-53*01		1-44*01
ascTT_354	3-53*01		1-44*01
ascTT_134	3-64*05		3-21*01
ascTT_03	3-74*01		2-23*01
ascTT_259	4-30-2*01	4-01*01	
ascTT_328	4-31*03	3-20*01	
ascTT_306	4-31*03		1-51*01

Figura 30

	VH	Vk	VI
ascTT_25	4-31*03		2-08*01
ascTT_85	4-31*03		2-08*01
ascTT_96	4-31*03		2-08*01
ascTT_185	4-31*03		2-08*01
ascTT_187	4-31*03		2-08*01
ascTT_312	4-31*03		2-08*01
ascTT_311	4-31*03		2-08*01
ascTT_313	4-31*03		2-08*01
ascTT_116	4-31*03		2-08*01
ascTT_196	4-39*01	1-06*01	
ascTT_47	4-39*01	2-28*01	
ascTT_295	4-39*01		1-40*01
ascTT_318	4-39*01		1-44*01
ascTT_337	4-39*01		1-44*01
ascTT_35	4-39*01		3-21*03
ascTT_40	4-39*01		3-21*03
ascTT_81	4-39*01		3-21*03
ascTT_93	4-39*01		3-21*03
ascTT_126	4-39*01		3-21*03
ascTT_166	4-39*01		3-21*03
ascTT_210	4-39*01		3-21*03
ascTT_224	4-39*01		3-21*03
ascTT_244	4-39*01		3-21*03
ascTT_370	4-39*01		3-21*03
ascTT_392	4-39*01		3-21*03
ascTT_232	4-39*01		3-21*03
ascTT_263	4-59*01		2-08*01
ascTT_15	4-59*01	1-39*01	
ascTT_122	4-59*01	3-15*01	
ascTT_276	4-59*01	3-15*01	
ascTT_302	4-59*01	3-15*01	
ascTT_110	4-59*03	1-39*01	
ascTT_34	4-59*04	1-39*01	
ascTT_173	4-61*01		2-14*03
ascTT_177	5-51*01	1-13*02	
ascTT_190	5-51*01	1-13*02	
ascTT_233	5-51*01	1-13*02	
ascTT_84	5-51*01	1-13*02	
ascTT_43	5-51*01	1-13*02	
ascTT_147	5-51*01	1-13*02	
ascTT_377	5-51*01	3-11*01	
ascTT_82	5-51*01	3-15*01	

Figura 31

	VH	Vk	VI
mnTT 16	1-02*02	2-30*01	
mnTT 125	1-02*02	3-20*01	
mnTT 436	1-02*02	3-20*01	
mnTT 507	1-02*02	3-20*01	
mnTT 238	1-02*02		1-44*01
mnTT 260	1-02*02		1-51*01
mnTT 451	1-02*02		1-51*01
mnTT 284	1-02*02		2-14*03
mnTT 20	1-02*02		2-23*01
mnTT 278	1-02*02		2-23*01
mnTT 166	1-02*02		3-21*02
mnTT 170	1-02*02		7-46*01
mnTT 548	1-02*03	4-01*01	
mnTT 70	1-02*03		3-01*01
mnTT 75	1-18*01	1-05*03	
mnTT 149	1-18*01	1-12*02	
mnTT 17	1-18*01	1-13*02	
mnTT 06	1-18*01	1-16*02	
mnTT 492	1-18*01	1-33*01	1-44*01
mnTT 490	1-18*01	1-33*01	
mnTT 321	1-18*01	1-39*01	
mnTT 542	1-18*01	2-30*01	
mnTT 318	1-18*01	3-15*01	
mnTT 101	1-18*01	3-20*01	
mnTT 29	1-18*01		1-40*01
mnTT 309	1-24*01	2-28*01	
mnTT 220	1-24*01	3-11*01	
mnTT 311	1-24*01	3-15*01	
mnTT 145	1-24*01		1-40*01
mnTT 217	1-24*01		3-21*02
mnTT 119	1-46*01	1-05*03	
mnTT 76	1-46*01	1-09*01	
mnTT 230	1-46*01	1-39*01	
mnTT 365	1-46*01	3-15*01	
mnTT 328	1-46*01	3-20*01	
mnTT 526	1-46*01	3-20*01	
mnTT 457	1-46*01		2-11*01
mnTT 57	1-46*01		2-14*03
mnTT 88	1-46*01		3-21*02
mnTT 530	1-69*01	1-05*03	
mnTT 263	1-69*01	1-33*01	
mnTT 317	1-69*01	1-33*01	
mnTT 61	1-69*01	1-39*01	
mnTT 331	1-69*01	1-39*01	
mnTT 395	1-69*01	1-39*01	
mnTT 487	1-69*01	2D-29*01	
mnTT 18	1-69*01	3-11*01	
mnTT 234	1-69*01	3-15*01	2-23*01

Figura 32

	VH	Vk	VI
mnTT 379	1-69*01	3-15*01	
mnTT 27	1-69*01	3-20*01	
mnTT 90	1-69*01	3-20*01	
mnTT 209	1-69*01	3-20*01	
mnTT 351	1-69*01	3-20*01	
mnTT 432	1-69*01	4-01*01	
mnTT 545	1-69*01	4-01*01	
mnTT 95	1-69*01		1-40*01
mnTT 279	1-69*01		1-40*01
mnTT 332	1-69*01		1-40*02
mnTT 147	1-69*01		1-44*01
mnTT 183	1-69*01		1-51*01
mnTT 01	1-69*01		2-14*03
mnTT 292	1-69*01		2-14*03
mnTT 244	1-69*01		2-14*04
mnTT 71	1-69*01		2-23*01
mnTT 525	1-69*01		2-23*01
mnTT 250	1-69*01		3-01*01
mnTT 136	1-69*01		1-51*01
mnTT 342	1-69*06	1-05*03	
mnTT 163	1-69*06	1-08*01	
mnTT 48	1-69*06	3-11*01	
mnTT 255	1-69*06	4-01*01	
mnTT 196	1-69*06		1-47*01
mnTT 226	1-69*06		3-21*02
mnTT 168	3-07*01	1-17*01	
mnTT 281	3-07*01	1-39*01	
mnTT 381	3-07*01	1-39*01	
mnTT 518	3-07*01	1-39*01	
mnTT 327	3-07*01		1-44*01
mnTT 64	3-07*02	1-05*03	
mnTT 434	3-07*02	1-13*02	
mnTT 303	3-09*01	1-37*01	
mnTT 419	3-09*01		1-47*01
mnTT 144	3-09*01		2-23*01
mnTT 13	3-09*01		2-23*03
mnTT 39	3-09*01		2-23*03
mnTT 37	3-09*01		3-21*02
mnTT 405	3-09*01		3-21*03
mnTT 131	3-09*01	3-11*01	
mnTT 121	3-11*01	1-05*03	
mnTT 473	3-11*01	1-05*03	
mnTT 385	3-11*01	1-17*01	
mnTT 256	3-11*01	1-33*01	
mnTT 382	3-11*01	3-20*01	
mnTT 66	3-11*01	4-01*01	
mnTT 111	3-11*01		3-25*01
mnTT 127	3-11*01	2-28*01	
mnTT 49	3-11*03	1-39*01	

Figura 33

	VH	Vk	VI
mnTT 537	3-11*03	3-11*01	
mnTT 246	3-11*03	3-15*01	
mnTT 481	3-11*03	4-01*01	
mnTT 272	3-11*03		3-21*01
mnTT 368	3-13*01	4-01*01	
mnTT 252	3-15*01	1-05*03	
mnTT 290	3-15*01	1-05*03	
mnTT 259	3-15*01	2-28*01	
mnTT 228	3-15*01	2D-29*01	
mnTT 326	3-15*01	4-01*01	
mnTT 192	3-15*01		1-51*01
mnTT 59	3-15*01		2-14*04
mnTT 12	3-15*01		7-46*01
mnTT 63	3-15*01		7-46*01
mnTT 233	3-21*01	1-05*03	
mnTT 221	3-21*01	1-39*01	
mnTT 41	3-21*01	3-20*01	
mnTT 56	3-21*01	4-01*01	
mnTT 383	3-21*01	4-01*01	
mnTT 148	3-21*01		1-47*01
mnTT 182	3-21*01		1-51*01
mnTT 215	3-21*01		1-51*01
mnTT 369	3-21*01		1-51*01
mnTT 443	3-21*01		2-11*01
mnTT 350	3-21*01		3-25*01
mnTT 335	3-23*01	1-05*03	
mnTT 15	3-23*01	1-17*01	
mnTT 78	3-23*01	1-33*01	3-21*02
mnTT 418	3-23*01	1-33*01	
mnTT 520	3-23*01	1-33*01	
mnTT 107	3-23*01	1-39*01	
mnTT 466	3-23*01	1-39*01	
mnTT 485	3-23*01	1-39*01	
mnTT 488	3-23*01	1-39*01	
mnTT 34	3-23*01	1D-12*01	
mnTT 158	3-23*01	2-30*01	
mnTT 176	3-23*01	2D-29*01	
mnTT 315	3-23*01	2D-29*01	
mnTT 116	3-23*01	3-11*01	2-23*01
mnTT 87	3-23*01	3-11*01	
mnTT 512	3-23*01	3-15*01	
mnTT 393	3-23*01	3-20*01	
mnTT 539	3-23*01	4-01*01	
mnTT 480	3-23*01		1-47*01
mnTT 322	3-23*01		2-11*01
mnTT 329	3-23*01		2-11*01
mnTT 162	3-23*01		2-14*03
mnTT 258	3-23*01		2-14*03
mnTT 216	3-23*01		2-14*04

Figura 34

	VH	Vk	VI
mnTT_108	3-23*01		3-01*01
mnTT_179	3-23*01		3-21*02
mnTT_195	3-23*01		3-21*02
mnTT_423	3-30*18	1-33*01	
mnTT_468	3-30*18	1D-8*01	
mnTT_153	3-30*18	2-28*01	
mnTT_286	3-30*18	3-11*01	
mnTT_242	3-30*18	4-01*01	
mnTT_185	3-30*18		1-44*01
mnTT_547	3-30*18		1-51*01
mnTT_251	3-30*18		2-14*03
mnTT_126	3-30*18		2-14*04
mnTT_415	3-30*18		2-14*04
mnTT_440	3-30*18		2-14*04
mnTT_72	3-30*18		2-23*01
mnTT_267	3-33*01	1-39*01	
mnTT_123	3-33*01	3-20*01	
mnTT_493	3-33*01	4-01*01	
mnTT_516	3-33*01		1-47*01
mnTT_184	3-33*01		2-14*03
mnTT_44	3-33*01		3-21*01
mnTT_156	3-33*01		3-21*01
mnTT_10	3-33*01		9-49*01
mnTT_140	3-33*01	1-39*01	
mnTT_138	3-33*01		3-01*01
mnTT_81	3-33*01		3-21*01
mnTT_506	3-43*01	4-01*01	
mnTT_08	3-48*01	1-08*01	
mnTT_522	3-48*01	1-39*01	
mnTT_106	3-48*01	4-01*01	
mnTT_91	3-48*01		1-40*01
mnTT_79	3-48*02	1-17*01	
mnTT_194	3-48*02	1-39*01	
mnTT_130	3-48*02	3-15*01	
mnTT_282	3-48*02		9-49*01
mnTT_426	3-49*03	3-11*01	
mnTT_474	3-49*05	1-17*01	
mnTT_270	3-49*05	2-28*01	
mnTT_453	3-53*01	1-33*01	
mnTT_305	3-53*01	3-15*01	
mnTT_137	3-53*01		2-08*01
mnTT_65	3-53*01		2-23*01
mnTT_358	3-64*05	1-05*03	
mnTT_53	3-64*05	3-11*01	
mnTT_447	3-72*01	1-05*03	
mnTT_283	3-72*01		4-69*01
mnTT_82	3-73*01		2-11*01
mnTT_177	3-74*01	1-05*03	
mnTT_09	3-74*01	4-01*01	

Figura 35

	VH	Vk	VI
mnTT 143	3-74*01		2-14*04
mnTT 276	4-04*07	1-17*01	
mnTT 102	4-04*07	3-15*01	
mnTT 191	4-04*07		1-44*01
mnTT 467	4-04*07		1-51*01
mnTT 374	4-04*07		3-25*01
mnTT 132	4-04*07	1-39*01	
mnTT 104	4-30-2*01	1-39*01	
mnTT 408	4-30-2*01		3-21*01
mnTT 319	4-31*01	1-05*03	
mnTT 323	4-31*01	3-15*01	
mnTT 50	4-31*02	1-39*01	
mnTT 188	4-31*02	3-11*01	
mnTT 14	4-31*02		2-14*03
mnTT 77	4-31*02		2-23*01
mnTT 257	4-31*03		1-40*01
mnTT 533	4-31*03		1-47*01
mnTT 546	4-34*01	1-05*03	
mnTT 02	4-34*01	1-08*01	
mnTT 266	4-34*01	1-12*01	
mnTT 380	4-34*01	1-16*01	
mnTT 157	4-34*01	1-33*01	
mnTT 146	4-34*01	1-39*01	
mnTT 384	4-34*01	3-11*01	
mnTT 73	4-34*01	3-20*01	
mnTT 376	4-34*01	3-20*01	
mnTT 236	4-34*01	4-01*01	
mnTT 89	4-34*01		1-36*01
mnTT 68	4-34*01		1-40*02
mnTT 69	4-34*01		1-47*01
mnTT 367	4-34*01		1-47*01
mnTT 32	4-34*01		1-51*01
mnTT 225	4-34*01		1-51*01
mnTT 511	4-34*01		1-51*01
mnTT 441	4-34*01		2-08*01
mnTT 294	4-34*01		2-14*03
mnTT 219	4-34*01		3-21*01
mnTT 165	4-34*01		3-25*01
mnTT 241	4-34*01		7-43*01
mnTT 523	4-34*01		9-49*01
mnTT 273	4-39*01	1-05*03	
mnTT 333	4-39*01	1-05*03	
mnTT 262	4-39*01	1-06*01	
mnTT 459	4-39*01	1-27*01	1-40*01
mnTT 361	4-39*01	1-33*01	
mnTT 84	4-39*01	1-39*01	
mnTT 312	4-39*01	1-39*01	
mnTT 141	4-39*01	2-28*01	
mnTT 455	4-39*01	2-28*01	

Figura 36

	VH	Vk	VI
mnTT 458	4-39*01	2-30*01	
mnTT 360	4-39*01	3-11*01	
mnTT 544	4-39*01	3-11*01	
mnTT 103	4-39*01	3-15*01	
mnTT 110	4-39*01	3-15*01	
mnTT 513	4-39*01	3-15*01	
mnTT 316	4-39*01	3-20*01	
mnTT 271	4-39*01	4-01*01	
mnTT 448	4-39*01	4-01*01	
mnTT 83	4-39*01		1-44*01
mnTT 05	4-39*01		1-51*01
mnTT 74	4-39*01		2-08*01
mnTT 254	4-39*01		2-08*01
mnTT 462	4-39*01		2-18*02
mnTT 171	4-39*01		3-01*01
mnTT 135	4-39*01		2-08*01
mnTT 340	4-59*01	1-05*03	
mnTT 477	4-59*01	1-17*01	
mnTT 28	4-59*01	1-39*01	
mnTT 47	4-59*01	1-39*01	
mnTT 353	4-59*01	3-11*01	
mnTT 269	4-59*01	3-15*01	
mnTT 338	4-59*01	4-01*01	
mnTT 357	4-59*01	4-01*01	
mnTT 118	4-59*01		1-40*01
mnTT 231	4-59*01		1-40*01
mnTT 337	4-59*01		1-40*02
mnTT 427	4-59*01		2-11*01
mnTT 519	4-59*01		2-23*01
mnTT 339	4-59*01		3-01*01
mnTT 442	4-59*01	1-39*01	
mnTT 207	4-61*01	1-12*01	
mnTT 218	4-61*01	1-39*01	
mnTT 159	4-61*01	2-28*01	
mnTT 211	4-61*01		1-44*01
mnTT 253	4-61*01		1-44*01
mnTT 521	4-61*01		1-44*01
mnTT 428	4-61*01		3-21*01
mnTT 151	4-61*07		2-11*01
mnTT 352	4-61*08	4-01*01	
mnTT 407	4-61*08	4-01*01	
mnTT 169	5-51*01	1-33*01	
mnTT 62	5-51*01	3-11*01	
mnTT 430	5-51*01	3-11*01	
mnTT 295	5-51*01	3-15*01	
mnTT 424	5-51*01	3-20*01	
mnTT 444	5-51*01	3-20*01	
mnTT 464	5-a*01	1D-33*01	
mnTT 26	5-a*01		2-14*03
mnTT 210	5-a*01		2-23*03

Figura 37

Sumario de 20 genes de la región VH

	Longitudes de CDRs										Chequeo de epibase			Aggressive
	genes de la línea germinal de la cadena pesada	Kabat CDR-H1	Kabat CDR2-H2	VNTI pI	Pos. de la clasificación	PTMs (w/o NXS/T)	NXS/T	Met en CDRs	Cisteína (para eliminar)	Desviaciones de la línea germinal	Epitopo de linfocito T fuerte	Tendencia teórica a la agregación		
1	hVH_1_2	5	17	9.4	14	2	0	1	0	0	0	intermedia		
2	hVH_1_18	5	17	9.2	9	2	0	0	0	0	0	alta		
3	hVH_1_69	5	17	9.3	7	6	0	0	0	0	0	intermedia		
4	hVH_1_46	5	17	9.2	21	6	0	1	0	0	0	n.d.		
5	hVH_3_7	5	17	8.6	6	4	0	1	0	0	0	baja		
6	hVH_3_11	5	17	9.0	17	2	0	1	0	0	0	n.d.		
7	hVH_3_15	5	19	9.0	12	3	0	1	0	0	0	baja		
8	hVH_3_21	5	17	9.0	11	3	0	1	0	0	0	intermedia		
9	hVH_3_23	5	17	8.7	1	3	0	1	0	0	0	intermedia		
10	hVH_3_30	5	17	9.3	2	4	0	1	0	0	0	intermedia		
11	hVH_3_33	5	17	9.3	15	4	0	1	0	0	0	n.d.		
12	hVH_3_48	5	17	8.9	19	3	0	1	0	0	0	intermedia		
13	hVH_3_53	5	16	8.7	16	3	0	1	0	0	0	intermedia		
14	hVH_3_73	5	19	9.5	33	3	0	1	0	0	0	n.d.		
15	hVH_3_74	5	17	9.1	19	4	0	1	0	0	0	n.d.		
16	hVH_4_4	6	16	9.3	29	6	0	0	1	0	0	n.d.		
17	hVH_4_31	7	16	9.2	13	6	0	0	0	0	0	n.d.		
18	hVH_4_39	7	16	9.0	3	6	0	0	0	0	0	n.d.		
19	hVH_5_51	5	17	8.6	6	1	0	0	0	0	0	intermedia		
20	hVH_6_1	7	18	9.3	39	3	0	1	0	0	0	n.d.		

Figura 38

Sumario de 20 genes de la región VL

	Genes de la línea germinal de la cadena ligera	Kabat CDR-L1	Kabat CDR-L2	VNTI pl	Pos. en la clasificación	PTMs (w/o NxS/T)	NxS/T	Met en CDRs	Cisteína (para eliminar)	Desviaciones de la línea germinal	Epítipo de linfocito T fuerte	Propensión teórica a la agregación
1	hVL_1-40	14	7	4.9	2	1	0	0	0	0	0	intermedia
2	hVL_1-47	13	7	5.0	5	0	0	0	0	0	0	intermedia
3	hVL_1-51	13	7	6.2	4	0	0	0	0	1	0	intermedia
4	hVL_2-11	14	7	6.7	6	0	0	0	0	0	0	n.d.
5	hVL_2-23	14	7	6.7	6	0	0	0	0	0	0	n.d.
6	hVL_2-14	14	7	5.6	1	0	0	0	0	0	0	alta
7	hVL_3-1	11	7	4.5	9	2	0	0	1	2	1*	n.d.
8	hVL_3-21	11	7	4.8	7	2	0	0	0	1	1*	n.d.
9	hVK_1_5	11	7	5.0	3	1	0	0	0	0	0	alta
10	hVK_1_6	11	7	6.9	16	0	0	0	0	0	0	n.d.
11	hVK_1_9	11	7	6.0	9	0	0	0	0	0	0	n.d.
12	hVK_1_12	11	7	6.0	15	0	0	0	0	0	0	n.d.
13	hVK_1_16	11	7	6.0	14	0	0	0	0	0	0	n.d.
14	hVK_1_17	11	7	6.7	11	0	0	0	0	0	0	n.d.
15	hVK_1_27	11	7	6.7	12	0	0	0	0	0	0	n.d.
16	hVK_1_39	11	7	6.0	2	0	0	0	0	0	0	alta
17	hVK_2_30	16	7	6.0	10	2	0	0	0	0	0	n.d.
18	hVK_3_11	11	7	6.3	6	0	0	0	0	0	0	intermedia
19	hVK_3_15	11	7	6.6	4	0	0	0	0	0	0	intermedia
20	hVK_3_20	12	7	6.3	1	0	0	0	0	0	0	baja
alt.	hVK_1_8	11	7	6.9	13	0	0	0	1	n.d.	n.d.	n.d.

Figura 39

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

Figura 40

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

Figura 41

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

Figura 42

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

Figura 43

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

Figura 44

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

Figura 45A

	Matsuda et al	Tominson et al	Secuencia de proteínas
IGHV1-2	VH 1-2	DP-75	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMG WINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAR
IGHV1-3	VH 1-3	DP-25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMG WSNAGNGNTKYSQEFQGRVTITRDTASATAYMELSSLRSEDMAVYYCAR
IGHV1-8	VH 1-8	DP-15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG
IGHV1-18	VH 1-18	DP-14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
IGHV1-24	VH 1-24	DP-5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMG GFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
IGHV1-45	VH 1-45	--	QMQLVQSGAEVKKGTSSVKVSCASGYTFTYRYLHWVRQAPGQALEWMG WITPFNGNTNYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCAR
IGHV1-46	VH 1-46	DP-7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGI INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
IGHV1-58	VH 1-58	DP-2	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGFTFTSSAMQWVRQARGQRLEWIGW IVVSGSNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
IGHV1-69*01	VH 1-69	DP-10	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
IGHV1-69*06, IGHV1-e	VH 1-69	DP-88	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
IGHV1-c	-	--	KSGASVKVSCSFSGFTITSYGIHWVQQSPGQGLEWMGWINPGNGSPSYAKK FQGRFTMTRDMSTTTAYTDLSSLTSEDMAVYYIAR
IGHV1-f	--	DP-3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDYYMHWVQQAPGKGLEWMGL VDPEDGETIYAIEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
IGHV2-5	VH 2-5	DP-76	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALI YWNDDKRYSPSLKSRLLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAHR
IGHV2-26	VH 2-26	DP-26	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAH IFSNDEKSYSTSLKSRLLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARI
IGHV2-70	VH 2-70	DP-27	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMCMVSWIRQPPGKALEWLALI DWDDDKYYSTSLKTRLLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARI
IGHV3-7	VH 3-7	DP-54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-9	VH 3-9	DP-31	EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSG ISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD

Figura 45B

IGHV3-11	VH 3-11	DP-35	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYI SSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-13	VH 3-13	DP-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQATGKGLEWVSA IGTAGDTYYPGSVKGRFTISRRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR
IGHV3-15	VH 3-15	DP-38	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVG RIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
IGHV3-16	VH 3-16		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSDMNWARDKAPGKGLEWVSG VSWNGSRTHYVDSVK.RRFIISRDNRSRNSLYLQKNRRRAEDMAVYYCVR
IGHV3-20	VH 3-20	DP-32	EVQLVESGGGVVPRGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVS GINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR
IGHV3-21	VH 3-21	DP-77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI SSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-23	VH 3-23	DP-47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV3-30	VH 3-30	DP-49	QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-30-3	--	DP-46	QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-30-5	--	--	QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV3-33	VH 3-33	DP-50	QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-35	VH 3-35	DP-59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSDMNWHQAPGKGLEWVSG VSWNGSRTHYADSVKGRFISRDNRSRNTLYLQTNLSLRAEDTAVYYCVR
IGHV3-38	VH 3-38P	--	EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCAASGFTVSSNEMSWIRQAPGKGLEWVSSI SGGSTYYADSRKGRFTISRDNKNTLYLQMNNLRAEGTAAYYCARY
IGHV3-43	VH 3-43	DP-33	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQAPGKGLEWVSLI SWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDEALYYCAKD
IGHV3-48	VH 3-48	DP-51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSY ISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
IGHV3-49	VH 3-49	3-49RB	EVQLVESGGGLVQPRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFRQAPGKGLEWVGF IRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
IGHV3-53	VH 3-53	DP-42	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-64	VH 3-64	DP-61	EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKLEYVSAI SSNGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMGLSRAEDMAVYYCAR
IGHV3-66	VH 3-66	DP-86	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSCGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-72	VH 3-72	DP-29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWVG RTRNKANSYTTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
IGHV3-73	VH 3-73	DA-11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGR IRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
IGHV3-74	VH 3-74	DP-53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVS RINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

Figura 45C

IGHV3-d	--	--	EVQLVESRGLVLPQGGSLRLSACAASGFTVSSNEMSWWRQAPGKGLEWVSSI SGGSTYYADSRKGRFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK
IGHV4-4	VH 4-4	DP-70	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIY TSGSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-28	VH 4-28	DP-68	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISSNWWGWIRQPPGKGLEWIGYI YYSGSTYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCAR
IGHV4-30-1	--	--	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG YIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-30-2	--	DP-64	QLQLQESGSGLVKPSQTLSTCAVSGGSISSGGYSWSWIRQPPGKGLEWIG YIYHSGSTYYNPSLKSRVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-30-4	--	DP-78	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-31	VH 4-31	DP-65	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG YIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-34	VH 4-34	DP-63	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI NHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG
IGHV4-39	VH 4-39	DP-79	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGIRQPPGKGLEWIGS IYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-59	VH 4-59	DP-71	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIY YSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-61	VH 4-61	DP-66	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-b	--	DP-67	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSISSGGYYWGIRQPPGKGLEWIGSI YHSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV5-51	VH 5-51	DP-73	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDRYSPSFQGGVTSADKISISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
IGHV5-a	--	--	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGRI DPSDSYTNYSFQGHVTISADKISISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
IGHV6-1	VH 6-1	DP-74	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNIRQSPSRGLEWLG RTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
IGHV7-4-1	--	DP-21	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYFTSYAMNWWVRQAPGQGLEWMG WINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR
IGHV7-81	VH 7-81	--	QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCASGYSFTTYGMNWWVPQAPGQGLEWMG WFNTYTGNPTYAQGFTGRFVFSMDTSASTAYLQISSLKAEDMAMYYCAR

51 funcionales
5 marcos de lectura abiertos

Figura 46A

	Zachau	Secuencia de proteínas
IGKV1-5	L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASS LESGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYS
IGKV1-6	L11	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYNYP
IGKV1-8	L9	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQYYSYP
IGKV1-9	L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYP
IGKV1-12	L5	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP
IGKV1-13	L4/18a	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSL ESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNYSYP
IGKV1-16	L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKSLIYAASS LQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYP
IGKV1-17	A30	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASS LQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYP
IGKV1-27	A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASL QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAP
IGKV1-33	O18	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQYDNLNLP
IGKV1-37	O14	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRVSSQGISSYLNWYRQKPGKVPKLLIYSASNL QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYGQRTYNAPP
IGKV1-39	O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP
IGKV1D-08	L24	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSYLAWYQQKPGKAPPELLIYAASL LQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQYYSFP
IGKV1D-12	L19	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP
IGKV1D-13	L18	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSL ESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNNSYP
IGKV1D-16	L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASS LQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYP
IGKV1D-17	L14	NIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRARQGISNYLAWYQQKPGKVPKHLIYAASS LQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYP
IGKV1D-33	O8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQYDNLNLP
IGKV1D-37	O4	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRVSSQGISSYLNWYRQKPGKVPKLLIYSASNL QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYGQRTYNAPP

Figura 46B

IGKV1D-39	O2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP
IGKV1D-42	L22	DIQMIQSPSFLSASVGDVSIICWASEGISSNLAWYLQKPGKSPKFLYDAKDL HPGVSSRFSGRSGSGTDFTLTIISLKPEDFAAYYCKQDFSYPP
IGKV1D-43	L23	AIRMTQSPFSLASVGDRTITCWASQGISSYLAWYQQKPAKAPKLFIIYASSL QSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTP
IGKV2-24	A23	DIVMTQTPLSPPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLI YKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFP
IGKV2-28	A19	DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDVGVYYCMQALQTP
IGKV2-29	A18b	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLI YEVSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP
IGKV2-30	A17	DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVSNRDSGVDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP
IGKV2-40	O11	DIVMTQTPLSPLPVTGEPASISCRSSQSLDSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI YTLSYRASGVDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP
IGKV2D-24	A7	DIVMTQTPLSPPVTLGQPASISFRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCTQATQFP
IGKV2D-26	A5	EIVMTQTPLSLSITPGEQASISCRSSQSLHSDGYTYLYWFLQKARPVSTLLIYE VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDFGVYYCMQDAQDPP
IGKV2D-28	A3	DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDVGVYYCMQALQTP
IGKV2D-29	A2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLI YEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDVGVYYCMQSIQLP
IGKV2D-30	A1	DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVSNWDSGVDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP
IGKV2D-40	O1	DIVMTQTPLSPLPVTGEPASISCRSSQSLDSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI YTLSYRASGVDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP
IGKV3-7	L10	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSCRASQSVSSSYLTWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATSIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDHNLP
IGKV3-11	L6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP
IGKV3-15	L2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP

Figura 46C

IGKV3-20	A27	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
IGKV3D-07	L25	EIVMTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLP
IGKV3D-11	L20	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWH
IGKV3D-15	L16	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP
IGKV3D-20	A11	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
IGKV4-1	B3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP
IGKV5-2	B2	ETTTLQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPGGAAIFIIQEATTL VPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFP
IGKV6-21	A26	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQS FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP
IGKV6D-21	A10	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQS FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP
IGKV6D-41	A14	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCQASEGIGNYLYWYQQKPDQAPKLLIKYASQ SISGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQGNKHP

38 funcionales

8 marcos de lectura abiertos

Figura 47A

	Kawasaki et al	Fripplat et al	Secuencia de proteínas
IGLV1-36	VL 1-11	1a	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYDD LLPSGVSDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP
IGLV1-40	VL 1-13	1e	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWHYQQLPGTAPKLLIYG NSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGS
IGLV1-44	VL 1-16	1c	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNN QRPSGVDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP
IGLV1-47	VL 1-17	1g	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYSNN QRPSGVDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGP
IGLV1-50	VL 1-18	1f	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVHWHYQQLPGTAPKLLIYG NSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCKAWDNSLNA
IGLV1-51	VL 1-19	1b	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNN KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAG
IGLV2-08	VL 1-2	2c	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYI EVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCQSYAGSNNF
IGLV2-11	VL 1-3	2e	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYI DVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYAGSYTF
IGLV2-14	VL 1-4	2a2	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYI VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYTSSSTL
IGLV2-18	VL 1-5	2d	QSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSYNRVSWYQQPPGTAPKLMYI VSNRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYTSSSTF
IGLV2-23	VL 1-7	2b2	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSYNLWSYQQHPGKAPKLMYI GSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYAGSSTF
IGLV2-33	VL 1-9	2f	QSALTQPPFVSGAPGQSVTISCTGTSSDVGDYDHFVYQKRLSTTSRLLIYN VNTRPSGISDLFSGSKSGNMASTISGLKSEVEANYHCSLYSSSYTF
IGLV3-1	VL 2-1	3r	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQKPGQSPVLVIYQDSK RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTA
IGLV3-9	VL 2-6	3j	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWHYQKPGQAPVLIYRDSN RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGQAGDEADYYCQVWDSSTA
IGLV3-10	VL 2-7	3p	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQKSGQAPVLIYEDSK RPSGIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNH
IGLV3-12	VL 2-8	3i	SYELTQPHSVSVATAQMARITCGGNNIGSKAVHWHYQKPGQDPVLIYSDSN RPSGIPERFSGSNPNTATLTISRIEAGDEADYYCQVWDSSTSDHP
IGLV3-16	VL 2-11	3a	SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGEALPKKYAYWYQKPGQFPVLIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGVQAEDEADYYCLSADSSGTYP
IGLV3-19	VL 2-13	3l	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQKPGQAPVLIYGKNN RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHL
IGLV3-21	VL 2-14	3h	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWHYQKPGQAPVLVYDSDS DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSTSDHP
IGLV3-22	VL 2-15	3e	SYELTQLPSVSVSPGQTARITCSGDVLGENYADWYQKPGQAPVLIYEDSE RYPGIPERFSGSTSGNTTTLTISRVLTEADYYCLSGDEDNP
IGLV3-25	VL 2-17	3m	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKYAYWYQKPGQAPVLIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGVQAEDEADYYCQVWDSSTSGTYP
IGLV3-27	VL 2-19	--	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKYARWFQKPGQAPVLIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGAQVEDEADYYCYSAADNNL

Figura 47B

IGLV3-32	VL 2-23P	3i1	SSGPTQVPAVSVALGQMARITCQGDSMEGSYEHWYQQKPGQAPVLIYDSS DRPSRIPERFSGSKSGNTTTLTITGAQAEDEADYYYQLIDNHA
IGLV4-3	VL 5-1	4c	LPVLTQPPSASALLGASIKLTCTLSSEHSTYIEWYQQRPGRSPQYIMKVKSD GSHSKGDGIPDRFMGSSSGADRYLTFSNLQSDDEAEYHCGESHTIDGQVG
IGLV4-60	VL 5-4	4a	QPVLTQSSSASASLGSVKTCTLSSGHSSYIIAWHQQQPKAPRYLMKLEG SGSYNKGSGVDRFSGSSSGADRYLTISNLQFEDEADYCYETWDSNT
IGLV4-69	VL 5-6	4b	QLVLTQSPSASASLGSVKTCTLSSGHSSYAIWHQQQPEKGPRLMKLNS DGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYCYCQTWGTG
IGLV5-37	VL 4-1	5e	QPVLTQPPSSASPGESARLTCTLPSDINVGSYNIWYQQKPGSPRYLLYY SDSDKQGGSGVPSRFSGSKDASANTGILLISGLQSEDEADYCYMIWPSNAS
IGLV5-39	--	5a	QPVLTQPTSLASPGASARFTCTLRGINVGTIRYIYWYQQKPGSLPRYLLRYK SDSDKQGGSGVPSRFSGSKDASTNAGLLISGLQSEDEADYCYAIWYSSTS
IGLV5-45	VL 4-2	5c	QAVLTQPSSLSASPGASALTCTLRGINVGTIRYIYWYQQKPGSPRYLLRYK SDSDKQGGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYCYMIWHSSAS
IGLV5-48	VL 4-3	5d	QPVLTQPTSLASPGASARLTCTLRGINLGSYRIFWYQQKPEPSPRYLLSY SDSSKHQGGSGVPSRFSGSKDASSNAGILVISGLQSEDEADYCYMIWHSSAS
IGLV5-52	VL 4-4	5b	QPVLTQPSSHSASSGASVRLTCLSSGFVSGDFWIRWYQQKPGNPPRYLLY YHSDSNKQGGSGVPSRFSGSNDASANAGILRISGLQPEDEADYCYCGTWHSN
IGLV6-57	VL 1-22	6a	NFMLTQPHSVSESPGKVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYED NQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYCYCQSYDSSN
IGLV7-43	VL 3-2	7a	QTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGYYPNWFQKPGQAPRALIYS TSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCYCLLYGGAQ
IGLV7-46	VL 3-3	7b	QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHYPYWFQKPGQAPRTLIYD TSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALLLGAQPEDEAEYCYCLLSYSGAR
IGLV8-61	VL 3-4	8a	QTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYPWYQQTPGQAPRTLIYS TNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYCVLYMGSGIS
IGLV9-49	VL 5-2	9a	QPVLTQPPSASASLGASVTLTCTLSSGYSNYKVDWYQQRPGKGRFVMRVG TGGIVGSKGDGIPDRFVLSGLNRYLTIKNIQEEDES DYHCGADHGSGSNFV
IGLV10-54	VL 1-20	10a	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNIVGNQGAAWLQQHQHPPKLLSYR NNNRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYCYCALDSSLISA
IGLV11-55	VL 4-6	--	RPVLTQPPSLASPGATARLPCTLSSDLSVGGKNMFYQQKPGSSPRFLY HYSDSKQLGPGVPSRVSGSKETSNTAFLISGLQPEDEADYCYQVYESSA

33 funcionales

5 marcos de lectura abiertos

Figura 48

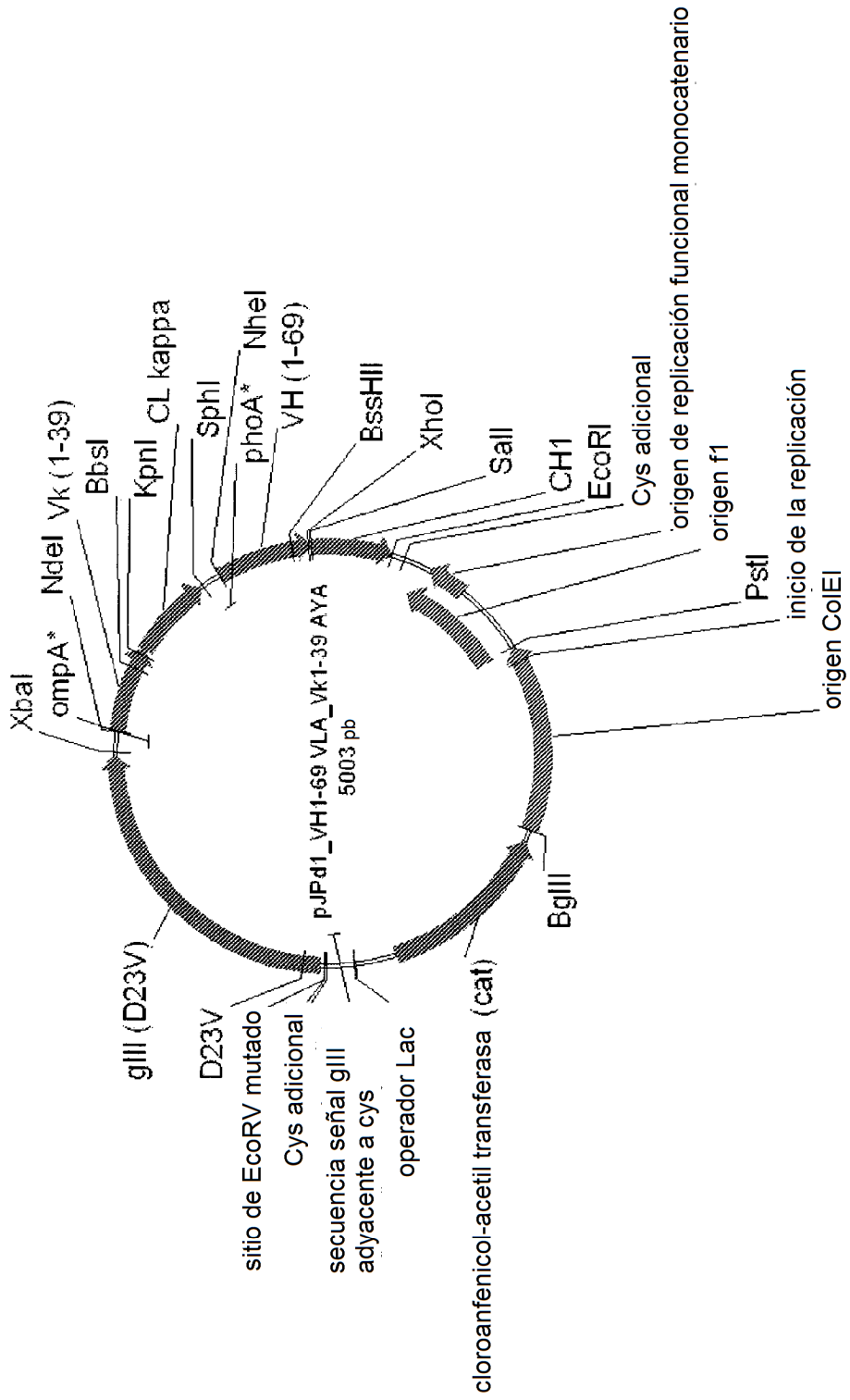


Figura 49

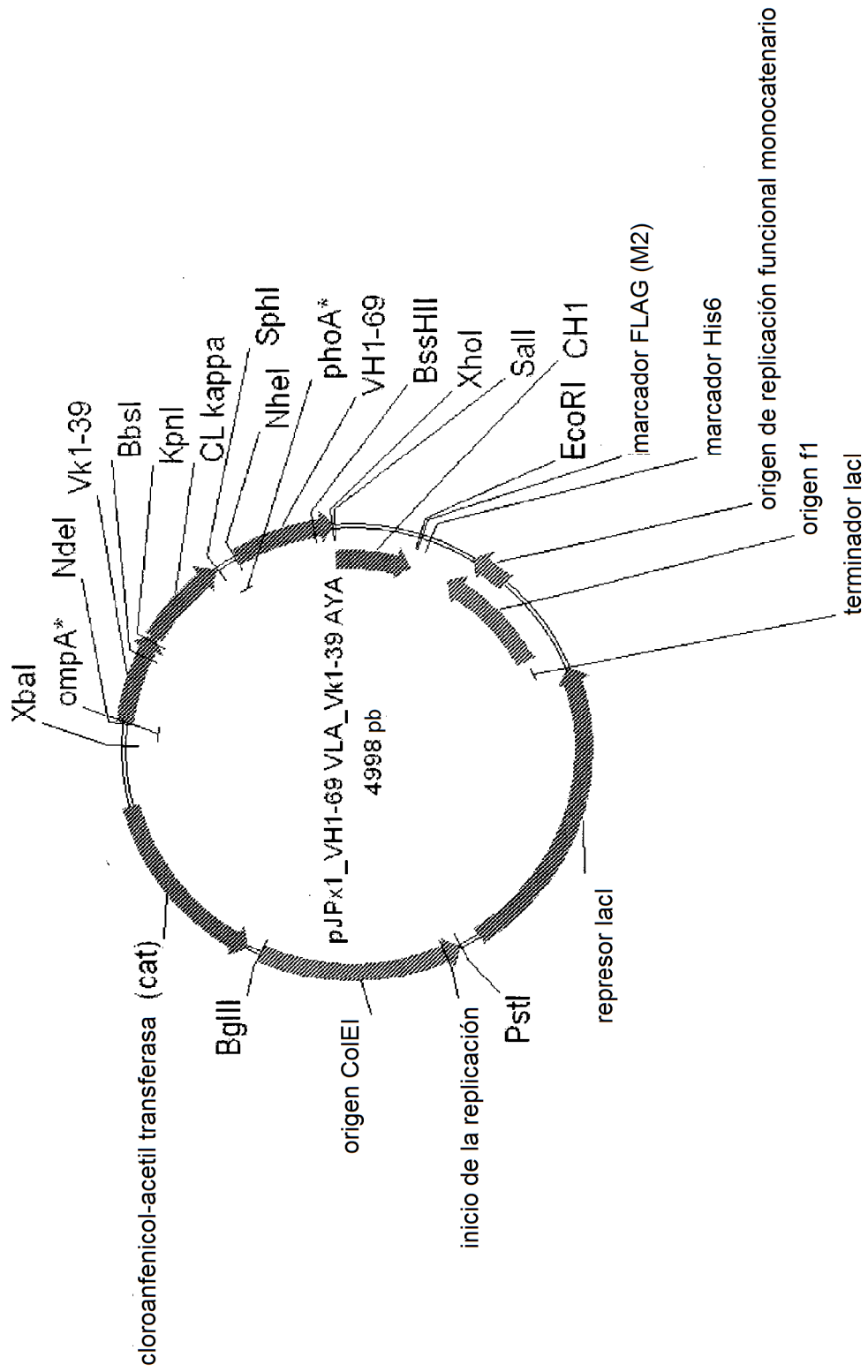


Figura 50

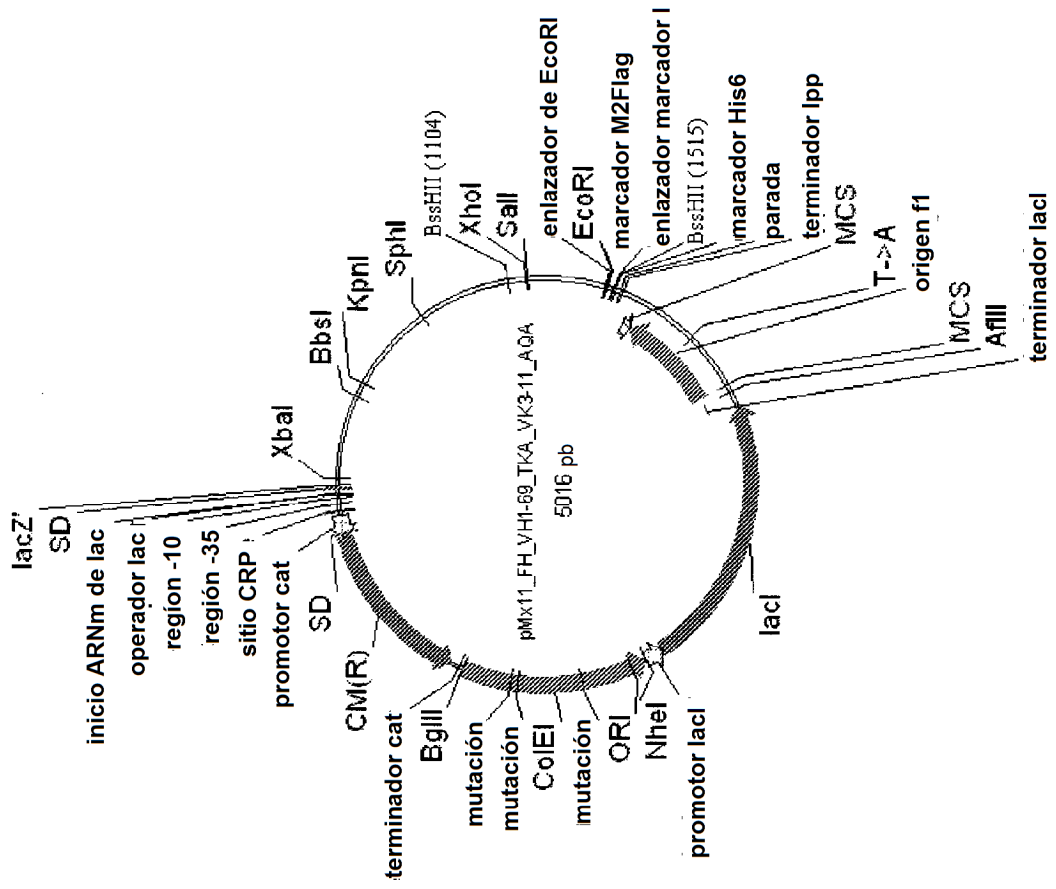


Figura 51

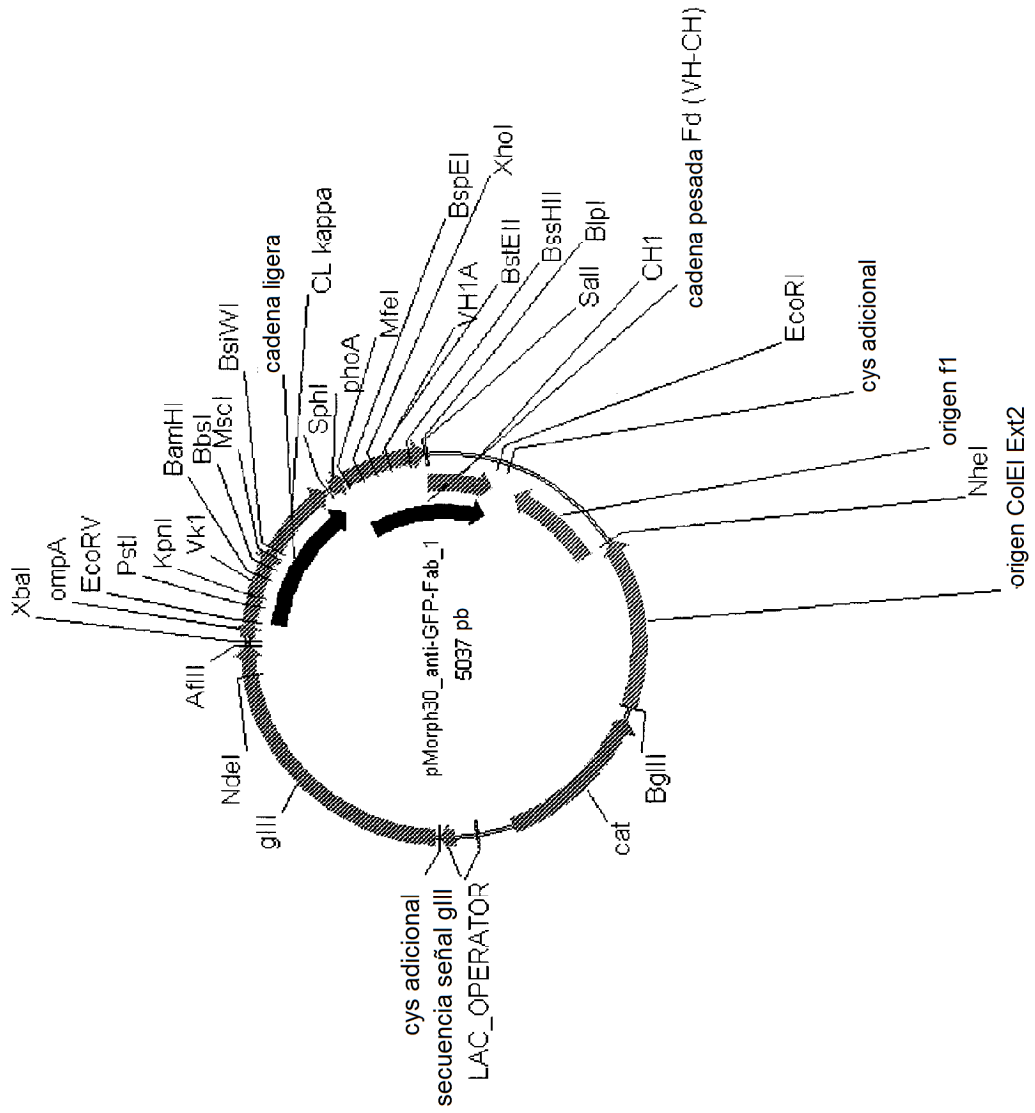


Figura 52

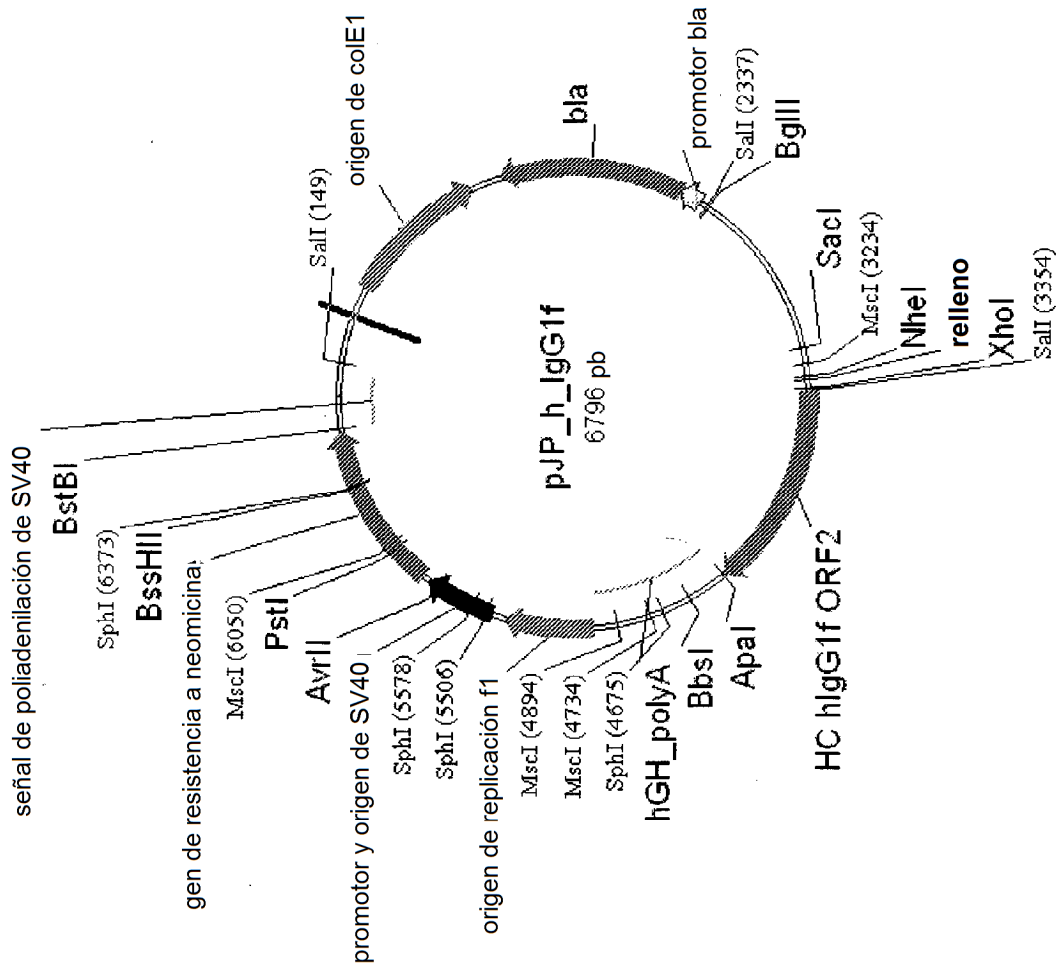


Figura 53

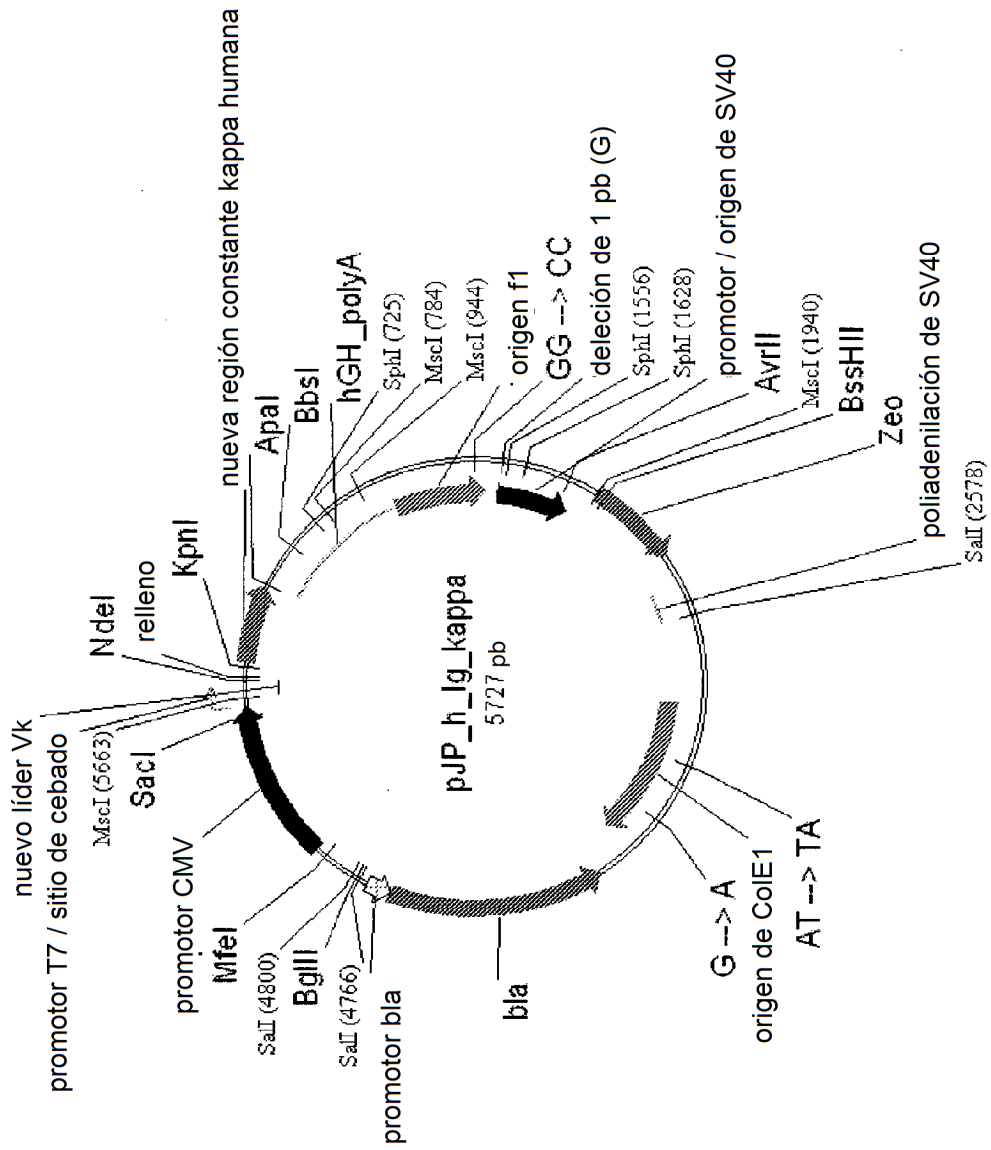


Figura 54

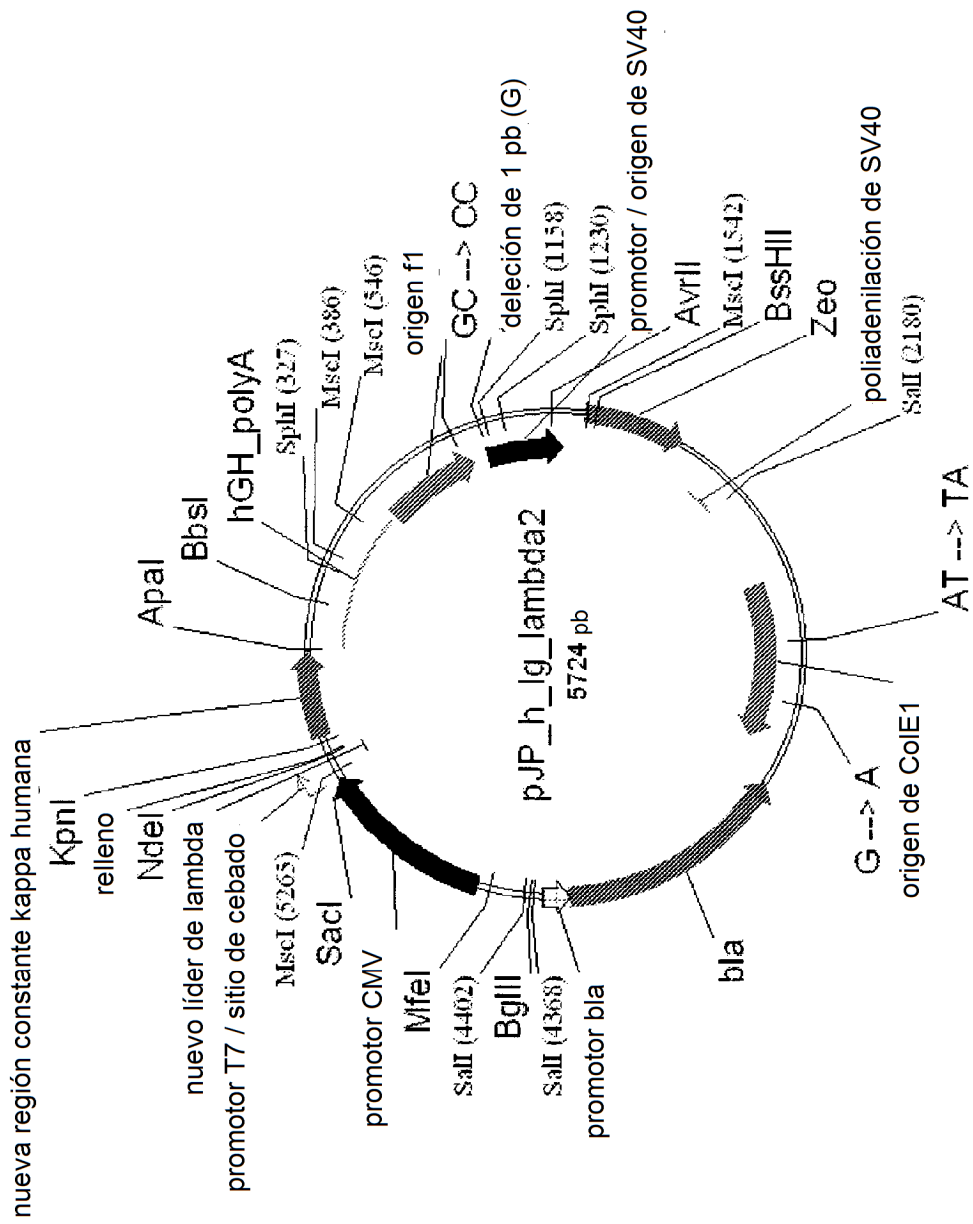


Figura 55

Presentación relativa de Fab en ELISA (pJPd1)	hVK																			
	hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1_40	hVL_1_47	hVL_1_51	hVL_2_11	hVL_2_14	hVL_2_23	hVL_3_1	hVL_3_21
1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.4	0.0
2	2.0	0.6		1.6	2.0		1.2	3.7	1.9		2.6	2.2	2.4			1.9	2.5	4.3	4.4	3.4
3			3.0		1.3	1.3		2.5			3.0				5.7	1.6		2.7	4.3	5.2
4	2.1	2.9		2.1	1.2	0.9	0.2	3.5			1.6					0.8		1.8	3.4	4.6
5				6.7	10.6	7.0	10.5	14.5	13.0		14.5		8.2	6.3			11.3	6.9	5.0	
6	5.5	4.3	6.7	8.2	10.3		6.0	29.0		0.0	4.6		12.4	8.1		8.4	6.4	8.9		9.8
7	8.1	11.7	10.0	11.5	14.5	6.4	7.8	14.2		19.4	12.1	8.9	16.7	13.0	11.0	10.5	9.7	10.1	9.4	9.2
8	10.0	16.1		11.3		5.0	8.7	11.6						0.0		6.5	8.8			11.8
9			6.1		8.4		17.1	10.8	4.1			13.3			10.2	13.6	9.1	7.4	4.6	7.4
10				5.4			9.1	13.1										9.5	8.8	16.6
11												12.3						17.1		
12					8.7		8.9							10.3					9.3	6.0
13	11.1		8.3	14.8	10.7	2.9	6.9		1.3						6.4	7.2		6.3	5.1	
14	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	3.6	0.2		0.5	0.2			0.0	0.3	0.2		0.8	0.0	0.4
15	6.4	9.5	8.7	8.4	8.0		5.0	8.7			10.0		8.8	3.2	7.1		4.7		7.0	1.8
16			4.5		3.2				0.3					8.3				2.7	2.2	5.2
17													0.0	0.0			0.0		1.4	
18	0.0	1.6				0.7		2.1					0.6				2.0	0.9	3.6	
19			2.6	1.8	1.3		0.4	3.7	0.9		1.9					0.0	2.1	3.0	3.8	
20		3.3	5.9	1.5								7.2				1.0		2.1		0.4

Los valores ilustran la presentación de Fab en comparación con el testigo; números más elevados indican niveles de presentación más altos

Figura 56

Expresión relativa de Fab en ELISA y BEL (pJPx1)	hVK																			
	hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1_40	hVL_1_47	hVL_1_51	hVL_2_11	hVL_2_14	hVL_2_23	hVL_3_1	hVL_3_21
1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.4	0.5		0.5	0.5	0.4	0.4	0.3	0.5	0.6	0.5	0.9		0.8			0.6	0.7	0.6	0.6
3	0.4		0.6	0.5	0.6			0.4	0.2		0.7		1.0					1.0		
4	0.5		0.3	0.4		0.3	0.3	0.1			0.7	0.5	0.5	1.0	0.8	0.7	0.8		0.7	0.7
5	0.7	0.9	0.4	0.9		0.5	0.5	0.3			0.7			1.2	1.0			0.8	0.5	0.7
6	0.5	0.6		0.6	0.6				0.4		0.7			0.8	1.1		0.9	1.0	0.5	
7	0.5	0.6	0.5	0.7	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3		0.6		0.9	1.2	1.1	0.9	0.8		0.3	0.8
8		1.0		0.6	0.9		0.6	0.5	0.6		0.8		1.0	1.2		0.9	0.9	1.0	0.7	0.9
9	0.8	0.7	0.8	0.9	0.6	0.6			0.3		0.7				1.1			0.9	0.4	0.8
10		1.0		0.8	0.9		0.4	0.0	0.4	0.4	0.7	0.7		1.1		0.7	0.8	1.0	0.6	0.8
11	0.3		0.7	0.2			0.6				0.6	1.0		1.1		0.5	0.9	0.5	0.2	0.8
12							0.7					0.8	0.8		1.2				0.8	
13	0.7	0.7	0.9	0.7	0.0	0.5	0.4	0.6	0.3	0.8	0.7	0.3	1.1	1.1	1.3	0.8	1.0	1.1	0.6	0.8
14	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2		0.1	0.2	0.1		0.1		0.1	0.3	0.2	0.2			0.1	0.2
15		0.9	0.6	0.6		0.6	0.6		0.4		0.8	0.7	0.4	1.2	1.1	0.6			0.6	0.6
16	0.8	0.8	0.1	0.7	0.2	0.4	0.4	0.2	0.5	0.6	0.6	1.1	1.0		0.9	1.0	0.7	1.0	0.5	0.7
17	0.0		0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0		0.1		0.6	0.7	0.9	0.5		0.0	0.3	0.4
18	0.3					0.3			0.3	0.2	0.3	0.6	0.9	0.7	0.8		0.6	0.7	0.5	0.6
19	0.5	0.5	0.5			0.3	0.2	0.3	0.2	1.0			1.0	1.0	1.1	0.7		1.0	0.7	
20	0.7	0.6		0.0		0.5	0.5	0.3	0.3	0.7	0.9			1.1	1.1	1.0		0.8	0.5	0.8

Los valores muestran la expresión de Fab en comparación con el testigo; valores más elevados indican niveles de expresión más altos

Figura 57

Estabilidad relativa de Fab frente a la temperatura en ELISA y BEL (pJPx1)	hVK_1_05																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 hVH_1_2	bg	60	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg
2 hVH_1_18	60	60		60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
3 hVH_1_46	60		60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
4 hVH_1_69*01	60		60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
5 hVH_3_07	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
6 hVH_3_11	60	60		60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
7 hVH_3_15	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
8 hVH_3_21	60		60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
9 hVH_3_23	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
10 hVH_3_30		60		60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
11 hVH_3_33	60																			
12 hVH_3_48																				
13 hVH_3_53	4	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
14 hVH_3_73	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
15 hVH_3_74		60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
16 hVH_4_04*03	60	60	bg	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
17 hVH_4_31	bg		4	60	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg
18 hVH_4_39	60		4																	
19 hVH_5_51	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
20 hVH_6_1	60	60		bg																

Los números 60 y 70 indican parejas VH/VL que son estables durante 45 min a 60 o 70°C en la modalidad analizada. El número 4 indica parejas termoinestables y bg (ruido de fondo) indica niveles de expresión bajos.

Figura 58

Estabilidad relativa de Fab en suero bovino en ELISA y BEL (pJPx1)	S																			
	hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1_40	hVL_1_47	hVL_1_51	hVL_2_11	hVL_2_14	hVL_2_23	hVL_3_1	hVL_3_21
1 hVH_1_2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2 hVH_1_18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3 hVH_1_46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4 hVH_1_69*01	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5 hVH_3_07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6 hVH_3_11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7 hVH_3_15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8 hVH_3_21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9 hVH_3_23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10 hVH_3_30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11 hVH_3_33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12 hVH_3_48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13 hVH_3_53	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14 hVH_3_73	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15 hVH_3_74	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16 hVH_4_04*03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17 hVH_4_31	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18 hVH_4_39	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19 hVH_5_51	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20 hVH_6_1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S significa estable y U inestable en las condiciones del ensayo; bg (ruido de fondo)

Figura 59

Estabilidad relativa de Fab en suero de ratón en ELISA y BEL (pJPx1)	hVK_1_05																			
	hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1_40	hVL_1_47	hVL_1_51	hVL_2_11	hVL_2_14	hVL_2_23	hVL_3_1	hVL_3_21
1	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S significa estable y U inestable en las condiciones del ensayo; bg (ruido de fondo)

Figura 60

Expresión relativa de IgG en ELISA frente a MOR03080	hVK																				hVL		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	hVL_1-51	hVL_2-23	
1	hVH_1_2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	hVH_1_18	0.4	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.5	0.1	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.3	0.0	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.2	0.2
3	hVH_1_46	0.9	0.9	0.4	0.2	0.3	0.5	0.6	0.5	0.0	0.1	0.4	0.1	0.4	0.1	0.9	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3
4	hVH_1_59*01	0.9	0.5	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1
5	hVH_3_07	0.9	1.3	1.5	0.9	1.5	0.9	1.8	1.2	0.3	0.4	1.8	0.4	1.8	0.4	0.3	0.8	0.9	1.2	0.8	0.7	1.2	0.3
6	hVH_3_11	0.5	1.4	0.9	0.9	1.2	0.9	1.7	1.8	1.1	0.6	1.6	0.2	0.3	1.3	1.3	1.9	1.1	0.4	0.4	0.4	1.6	0.3
7	hVH_3_15	0.4	0.8	0.9	0.7	1.5	0.8	1.7	1.8	0.6	0.8	1.9	0.5	0.1	0.2	0.9	0.8	0.9	0.4	0.9	0.4	1.0	0.2
8	hVH_3_21	0.8	0.9	0.4	0.5	0.0	0.0	0.5	0.8	0.1	0.2	0.3	0.5	0.5	0.3	0.9	0.7	1.2	0.9	0.4	0.1	0.4	0.1
9	hVH_3_23	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.0	0.0	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.3	0.1	0.1
10	hVH_3_30	0.7	0.6	0.3	0.3	0.4	0.5	0.5	1.0	0.1	0.1	0.9	0.4	0.8	0.3	0.4	0.8	0.3	0.4	1.0	0.5	0.5	0.2
11	hVH_3_33	0.0	0.6	0.2	0.2	0.4	0.5	0.2	0.8	0.3	0.6	0.9	0.3	1.0	0.4	0.6	0.5	0.9	0.5	0.9	0.5	0.7	0.5
12	hVH_3_48	0.6	0.7	0.2	0.3	0.5	0.5	0.9	0.5	0.3	0.7	0.3	0.4	0.6	0.4	0.7	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.3
13	hVH_3_53	0.8	0.7	0.4	0.2	0.3	0.5	0.2	0.2	0.0	0.3	0.5	0.3	1.1	0.2	0.4	0.3	0.8	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5
14	hVH_3_73	1.1	1.0	0.9	0.5	1.1	1.0	0.9	0.8	0.3	0.2	0.1	1.1	1.2	0.8	0.7	0.8	0.4	0.1	1.0	0.1	1.0	1.1
15	hVH_3_74	0.6	1.0	0.5	0.0	0.8	0.2	1.1	0.3	0.7	0.1	1.0	0.6	1.3	0.6	1.2	0.8	0.6	1.0	0.6	1.0	0.3	0.3
16	hVH_4_04*03	0.6	1.1	0.6	0.8	0.4	0.8	0.9	1.0	0.2	0.3	1.1	1.1	0.9	0.4	0.6	0.7	0.4	0.7	0.4	0.7	1.3	0.5
17	hVH_4_31	0.0	0.2	0.6	0.4	0.0	0.2	0.0	0.5	0.0	0.0	0.1	0.4	0.8	0.1	0.3	0.2	0.5	0.3	0.2	0.5	0.3	0.4
18	hVH_4_39	0.3	0.8	0.7	0.9	0.5	1.0	0.4	1.2	0.2	0.2	1.0	1.2	1.1	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.4	0.9	0.6
19	hVH_5_51	0.4	0.9	0.5	0.8	0.5	0.6	1.0	1.2	0.7	0.6	1.2	1.1	1.3	0.8	0.5	0.3	0.8	0.7	0.8	0.7	1.3	0.7
20	hVH_6_1	0.0	1.2	1.3	1.1	1.4	1.3	1.2	1.1	0.3	0.9	1.3	1.3	1.4	0.2	0.5	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	1.4	0.5

Los valores ilustran la expresión de IgG en comparación con el testigo; valores más elevados indican niveles de expresión más altos

Figura 61

Estabilidad relativa de IgG en suero bovino en ELISA después de 14 días de incubación a 37°C		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1	hVH_1_2	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	
2	hVH_1_18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
3	hVH_1_46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
4	hVH_1_69*01	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
5	hVH_3_07	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
6	hVH_3_11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
7	hVH_3_15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
8	hVH_3_21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
9	hVH_3_23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
10	hVH_3_30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
11	hVH_3_33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
12	hVH_3_48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
13	hVH_3_53	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
14	hVH_3_73	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
15	hVH_3_74	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
16	hVH_4_04*03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
17	hVH_4_31	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg
18	hVH_4_39	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
19	hVH_5_51	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
20	hVH_6_1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

S significa estable y U inestable en las condiciones del ensayo; bg (ruido de fondo)