

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 427**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2003 E 10010455 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2314622**

54 Título: **Marcos de inmunoglobulina que demuestran estabilidad mejorada en el ambiente intracelular y métodos para su identificación**

30 Prioridad:

22.05.2002 US 382649 P

03.01.2003 US 438256 P

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL
RESEARCH UNIT LLC (100.0%)**

**Wagistrasse 21
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**TISSOT, KATHRIN;
EWERT, STEFAN;
AUF DER MAUR, ADRIAN;
BARBERIS, ALCIDE y
ESCHER, DOMINIK**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 656 427 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

Marcos de inmunoglobulina que demuestran estabilidad mejorada en el ambiente intracelular y métodos para su identificación.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a química de proteínas, biología molecular e inmunología.

Antecedentes de la técnica relacionada

10 Los anticuerpos pueden reconocer y dirigirse a casi cualquier molécula con alta especificidad y afinidad. Esta característica ha sido explotada para convertir estas proteínas naturales en poderosas herramientas para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Los avances en la tecnología de ADN recombinante han facilitado la manipulación, clonación y expresión de genes de anticuerpos en una amplia variedad de células no linfoides (Skerra, 1988, Martineau, 1998; Verma, 1998). Se han construido varios fragmentos de anticuerpos diferentes para adaptarse mejor a las diversas aplicaciones. La entidad más pequeña que conserva la capacidad completa de unión a antígeno de la inmunoglobulina parental completa es el fragmento Fv monocatenario (scFv) (Bird, 1988). Este fragmento de anticuerpo comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera unidas por un enlazador peptídico flexible, que permite la expresión de la proteína a partir de un único gen.

20 Los fragmentos de anticuerpos tienen varias ventajas importantes en comparación con la molécula de inmunoglobulina completa. Debido a su tamaño más pequeño, la expresión se facilita y el desempeño se potencia en una variedad de células huésped de expresión, tales como células de *E. coli* (Plückthun, 1996). Además, los fragmentos de anticuerpos permiten una penetración tumoral mejorada en aplicaciones *in vivo* (Yokota, 1992) y se pueden unir covalentemente a diversas moléculas efectoras para enfoques terapéuticos.

25 Los anticuerpos naturales, que son secretados por las células plasmáticas, han evolucionado para funcionar en un entorno oxidante extracelular. Para obtener su estructura plegada funcional, generalmente requieren la formación de puentes disulfuro dentro de los dominios separados, que son cruciales para la estabilidad del plegamiento de la inmunoglobulina. En contraste con los anticuerpos de longitud completa, los fragmentos de anticuerpos scFv o Fab pueden, en principio, expresarse funcionalmente en un entorno reductor dentro de cualquier célula y dirigirse a cualquier compartimento para dirigir proteínas intracelulares y así evocar efectos biológicos específicos (Biocca, 1991). De hecho, algunos fragmentos de anticuerpos monocatenarios intracelulares, que se llaman intracuerpos, se han aplicado con éxito para modular la función de proteínas objetivo intracelulares en diferentes sistemas biológicos. Por lo tanto, se ha demostrado la resistencia contra infecciones virales en biotecnología vegetal (Tavladoraki, 1993; Benvenuto, 1995), se ha demostrado la unión de intracuerpos a proteínas del VIH (Rondon, 1997) y se ha descrito la unión a productos de oncogenes (Biocca, 1993; Cochet, 1998 Lener, 2000). Además, los anticuerpos intracelulares prometen ser una herramienta valiosa para caracterizar la función de una gran cantidad de genes ahora identificados a través de la secuenciación del genoma humano (Richardson, 1995; Marasco, 1997). Por ejemplo, se pueden usar en un enfoque de genómica funcional para bloquear o modular la actividad de proteínas recién identificadas, lo que contribuye a la comprensión de sus funciones. Finalmente, los intracuerpos tienen posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, por ejemplo, en entornos de terapia génica.

40 A pesar de estas grandes perspectivas, la generación de intracuerpos funcionales todavía está limitada por su inestabilidad e insolubilidad o propensión a agregarse. El entorno reductor del citoplasma impide la formación de puentes disulfuro intracatenarios conservados, lo que hace que un alto porcentaje de fragmentos de anticuerpos sea inestable y, como consecuencia, no funcional dentro de la célula (Biocca, 1995; Proba, 1997). La estabilidad y solubilidad de los fragmentos de anticuerpos representa, por lo tanto, un obstáculo principal para la aplicación de intracuerpos como potenciales moduladores de la función proteica *in vivo*. Hasta ahora, no se pueden hacer predicciones sobre los requisitos de secuencia que hacen que un fragmento de anticuerpo sea funcional en un entorno intracelular.

45 Existe, por lo tanto, una necesidad de fragmentos de anticuerpos que tengan un buen desempeño en una amplia gama de diferentes tipos de células y, por lo tanto, pueden usarse como marcos para diversas especificidades de unión. Tales marcos pueden usarse para construir bibliotecas para cribado intracelular o pueden servir como aceptores para las porciones de unión de un anticuerpo existente.

50 Además de ser especialmente adecuados para aplicaciones intracelulares, tales fragmentos de anticuerpos o anticuerpos completos basados en marcos de dominio variable muy estables también tienen una clara ventaja sobre otros anticuerpos en numerosas aplicaciones extracelulares e *in vitro*. Cuando tales estructuras se producen en un entorno oxidante, se pueden formar sus puentes disulfuro, mejorando aún más su estabilidad y haciéndolas altamente resistentes a la agregación y a la degradación de la proteasa. La semivida *in vivo* (y por lo tanto la resistencia a la agregación y degradación por proteasas séricas) es, además de la afinidad y especificidad, el factor

más importante para el éxito de anticuerpos en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico (Willuda, 1999). La semivida de los fragmentos de anticuerpos puede incrementarse aún más mediante la unión covalente de moléculas poliméricas tales como polietilenglicol (PEG) (Weir, 2002). Las moléculas estables de este tipo representan un avance significativo en el uso de anticuerpos, especialmente, pero no exclusivamente, cuando no se desea la funcionalidad de Fc.

La gran importancia práctica de las bibliotecas de fragmentos de anticuerpos ha motivado la investigación en esta área. Winter (documento EP 0368684) ha proporcionado la clonación inicial y la expresión de genes de región variable de anticuerpos. Partiendo de estos genes, ha creado grandes bibliotecas de anticuerpos que tienen una alta diversidad tanto en las regiones determinantes de complementariedad (CDR) como en las regiones marco. Winter no revela, sin embargo, la utilidad de diferentes marcos para la construcción de bibliotecas.

La enseñanza de Plückthun (documento EP 0859841), por otro lado, ha intentado mejorar el diseño de la biblioteca limitando los marcos a un número definido de secuencias consenso sintéticas. Los esfuerzos de ingeniería de proteínas que implican la introducción de una gran cantidad de mutaciones diseñadas racionalmente han sugerido previamente mutaciones hacia la secuencia consenso respectiva como un medio adecuado para la mejora de la estabilidad de dominios de inmunoglobulina variables aislados (Ohage 1999; Ohage 1999 y el documento US 5.854.027).

Plückthun (documento EP 0859841) describe métodos para la optimización adicional de afinidades de unión basadas en estas secuencias consenso. La patente de Plückthun también reconoce el continuo aumento en el conocimiento sobre los anticuerpos y en consecuencia tiene como objetivo incluir tales hallazgos futuros en el diseño de la biblioteca. Sin embargo, no se sugieren posibles mejoras adicionales de los marcos de consenso sintéticos.

Las enseñanzas de Winter, Plückthun y otros (por ejemplo, Soderlind, documento WO 0175091) han intentado crear grandes bibliotecas de anticuerpos con un enfoque en alta diversidad en las CDR para la selección y aplicación de los scFv seleccionados bajo condiciones oxidantes. Sin embargo, todas estas bibliotecas no están optimizadas para aplicaciones intracelulares y, por lo tanto, no son útiles para la selección y aplicaciones en un entorno reductor u otras condiciones que establecen requisitos especiales sobre la estabilidad y solubilidad del fragmento de anticuerpo expresado.

Las cualidades requeridas para que los fragmentos de anticuerpo funcionen bien en un entorno reductor, por ejemplo, el citoplasma de las células procariotas y eucariotas, no están claras. La aplicación de anticuerpos intracelulares o "intracuerpos" está por lo tanto actualmente limitada por su comportamiento impredecible en condiciones reductoras, lo que puede afectar su estabilidad y propiedades de solubilidad (Biocca, 1995; Worn, 2000). Las presentes solicitudes de patente (EP1040201, EP1166121 y WO0200729) y publicaciones (Visintin, 1999) concernientes al cribado intracelular para intracuerpos se centran en la tecnología de cribado, pero no describen secuencias de anticuerpos específicas que sean funcionales en células eucariotas, en particular en levadura, y, por lo tanto, útiles para la construcción de la biblioteca en este contexto.

Visintin y Tse han descrito independientemente el aislamiento de la llamada secuencia consenso intracelular (ICS) (Visintin, 2002; Tse, 2002). Esta secuencia se derivó de varias secuencias que se habían aislado a partir de un cribado de interacción antígeno-anticuerpo en levadura. La entrada en el cribado intracelular, sin embargo, fue muy sesgada debido a la selección previa de presentación de fagos. Por lo tanto, todas menos una de las secuencias de entrada, pertenecían al subgrupo VH 3 en el caso de Visintin et al. La secuencia consenso publicada ICS es completamente idéntica a la secuencia consenso para el subgrupo VH 3 humano descrito por Knappik (2000) y el documento EP0859841. 60 de los 62 aminoácidos de la ICS son también idénticos a la secuencia consenso general del dominio VH humano que Steipe propuso como base para la construcción de dominios variables con estabilidad mejorada (Patente de Estados Unidos N° 6.262.238). Estos trabajos, a su vez, se basaron en colecciones de secuencias anteriores (es decir, Kabat, 1991 y definiciones de subgrupos de dominio variable y determinantes estructurales (TomLinson, 1992, Williams, 1996, Chothia, 1989 y Chothia, 1987). Sin embargo, debido a que la entrada a la selección del intracuerpo estaba muy sesgada (es decir, en el caso de Visintin et al., todos menos uno de los dominios VH eran VH3), el aislamiento de las secuencias de VH3 del cribado intracelular no es particularmente sorprendente. Debido al gran sesgo de su biblioteca de entrada, el trabajo de Tse et al. y Visintin et al. no proporciona una evaluación exhaustiva del repertorio del dominio variable humano como sería proporcionado por una investigación imparcial y como se requiere para identificar los marcos intracuerpo útiles presentes en el repertorio humano.

Hemos descrito previamente un sistema que permite la selección de intracuerpos estables y solubles en levadura, independientemente de su especificidad de unión a antígeno (Auf der Maur (2001), WO0148017). Este enfoque permite el cribado eficiente de bibliotecas de scFv y el aislamiento de estructuras específicas, que son estables y solubles en el entorno reductor de la célula de levadura. El objetivo sigue siendo aislar realmente las secuencias marco y utilizar los patrones en un primer paso para predecir qué tipos de secuencia serían más estables en el entorno reductor y en un segundo paso identificar mediante análisis, recombinación y otros experimentos *in vivo* e *in vitro* la secuencia óptima.

Breve resumen de la invención

5 La presente invención llena un enlace faltante en el campo de la generación de anticuerpos. Proporciona secuencias marco de dominio variable de anticuerpo con características superiores en cuanto a estabilidad y solubilidad. Estas son funciones cruciales para muchas aplicaciones relevantes, como en diagnóstico, terapia o investigación. Estos marcos pueden usarse para el injerto de especificidades de unión existentes o para la generación de bibliotecas de anticuerpos con alta estabilidad y solubilidad.

10 Las bibliotecas de ScFv se usaron para el aislamiento de marcos que son estables y solubles en el entorno reductor de la célula de levadura. El desempeño de los marcos aislados se ha caracterizado posteriormente en líneas celulares humanas y en experimentos *in vitro*. Los marcos descritos pueden servir directamente como estructuras principales aceptables para especificidades de unión existentes o para construir bibliotecas de CDR mediante aleatorización de uno o más de los bucles hipervariables para su uso en entornos reductores o desafiantes. Las secuencias de dominio variable aisladas se han analizado adicionalmente mediante alineación para identificar familias de secuencias preferidas. A partir de esas familias de secuencias de dominio variable preferidas, se eligieron las secuencias óptimas en base a un análisis estructural que excluye las secuencias que contienen residuos de marco que alteran el plegado de la inmunoglobulina. Los candidatos de secuencia de dominio variable identificados se recombinaron posteriormente en todas las variaciones posibles y las combinaciones óptimas de los dominios variables de cadena ligera y pesada se seleccionaron mediante análisis de su desempeño en levadura, células de mamífero e *in vitro*.

20 Estos scFv optimizados y sus marcos de dominio variable constituyentes, así como otros fragmentos de anticuerpos o anticuerpos completos derivados de los mismos, son ideales, por ejemplo, como cadenas principalesceptoras para especificidades de unión existentes o para la construcción de bibliotecas de CDR mediante aleatorización de uno o más de los bucles hipervariables para usar en entornos reductores o desafiantes. Los anticuerpos adecuados para aplicaciones intracelulares son, por definición, más estables y solubles. En consecuencia, su uso también será ventajoso en aplicaciones fuera del entorno intracelular.

25 La invención se refiere a marcos de dominios variables de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo Fv monocatenarios (ScFv) que pueden incorporarse en diversos fragmentos de anticuerpos o anticuerpos completos. Se proporcionan clases de fragmentos de dominios variables de anticuerpos que son los más estables y solubles y, por lo tanto, más adecuados para aplicaciones intracelulares. También se proporcionan secuencias marco específicas de dominios variables de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos scFv que muestran el desempeño más alto en ensayos intracelulares. La invención también se refiere a secuencias marco específicas de dominios variables de anticuerpos y combinaciones sintéticas de dominios variables de cadena ligera y pesada en fragmentos scFv que son, por ejemplo, óptimos para aplicaciones intracelulares y muestran un desempeño óptimo *in vitro* con respecto a la estabilidad y solubilidad.

La invención proporciona reactivos marco monocatenarios que tienen las estructuras generales:

35 NH₂-VL-enlazador-VH-COOH o

NH₂-VH-enlazador-VL-COOH,

caracterizado porque el dominio VL tiene la secuencia marco de SEQ ID NO. 4 y el dominio VH tiene la secuencia marco de SEQ ID NO. 11, en donde el marco del scFv es estable en condiciones reductoras.

40 En otra realización de la invención, el marco monocatenario puede fusionarse con un segundo residuo proteínico para producir un constructo de fusión de la estructura general:

NH₂-VL-enlazador-VH-segunda proteína-COOH

NH₂-segunda proteína-VL-enlazador-VH-COOH.

La orientación de las regiones VH y VL en estos constructos de fusión puede invertirse.

45 En otra realización de la invención, los dominios variables se pueden incorporar en un fragmento Fab, que se puede fusionar adicionalmente a un segundo residuo de proteína para producir constructos de fusión de la estructura general:

NH₂-VH-CH-segunda proteína-COOH y NH₂-VL-CL-COOH.

La segunda proteína se puede fusionar con el extremo terminal C de la cadena pesada o la cadena ligera.

En una realización preferida, la segunda proteína del constructo de fusión de marco monocatenario o Fab es una proteína que proporciona una lectura para ensayos intracelulares, bien sea directamente o mediante activación transcripcional.

5 Se divulgan aquí clases marco de dominios variables de anticuerpos y secuencias de dominios variables y scFv que son adecuados para injertar los bucles hipervariables de anticuerpos existentes, por ejemplo, para obtener anticuerpos que son funcionales en un entorno reductor o desafiante.

10 Se describen adicionalmente en el presente documento clases de marcos de dominios variables de anticuerpos y secuencias de dominios variables y scFv que, por ejemplo, a través de la aleatorización de uno o más de los bucles hipervariables de dichos marcos, son adecuados para la creación de bibliotecas para su uso en un ambiente reductor o desafiante.

También se describe aquí el uso de las secuencias descritas en la identificación de residuos conservados y secuencias consenso.

15 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que resultan del uso de los marcos descritos pueden usarse como reactivos en la validación del objetivo y en terapia, prevención y diagnóstico de enfermedades humanas, animales y vegetales. Los anticuerpos se pueden usar en forma de proteína o ADN que codifica una proteína de este tipo y no se limitan a aplicaciones intracelulares.

La invención está definida por las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra el resultado de un cribado típico de "control de calidad" en levadura ensayada por activación de la expresión de lacZ (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1). Los clones positivos seleccionados (negro) se identificaron en varios cribados diferentes y las secuencias correspondientes de los clones positivos se pueden encontrar en las Tablas 1 y 2. Las secuencias seleccionadas se comparan con el control positivo, el injerto lambda muy estable (gris oscuro).

25 La Figura 2 muestra el desempeño de los marcos aislados de un cribado típico de "control de calidad" en levadura (negro) en la línea celular humana HeLa, ensayada por la activación de la expresión de luciferasa en comparación con el injerto lambda muy estable (gris oscuro). El control positivo Gal4-VP16 (blanco) proporciona el nivel máximo posible de activación transcripcional en el sistema. La actividad de la luciferasa se corrigió para la eficacia de la transfección.

30 La Figura 3 muestra el desempeño *in vivo* de las combinaciones de marco superiores ensayadas en levadura mediante la activación de la expresión de lacZ. Las secuencias marco (negro) se comparan con el control positivo (el injerto lambda muy estable (gris oscuro)). La numeración de los marcos es como se describe en la Tabla 5.

35 La Figura 4 muestra el desempeño *in vivo* de las combinaciones de marco superior analizadas en la línea celular humana HeLa mediante la activación de la expresión de luciferasa e ilustradas en comparación con el injerto lambda muy estable (gris oscuro). El control positivo, Gal4-VP16 (blanco) proporciona el nivel máximo posible de activación transcripcional en el sistema. La actividad de la luciferasa se corrigió para la eficacia de la transfección.

La Figura 5 muestra el desempeño *in vivo* de las combinaciones de marco superiores evaluadas por la cantidad de proteína soluble producida en el citoplasma de la cepa de levadura *S. cerevisiae* JPY9.

La Figura 6 muestra el comportamiento de expresión de combinaciones de marcos seleccionados en el periplasma de *E. coli*. La flecha indica la ubicación de la banda correspondiente a los marcos de scFv.

40 La Figura 7 muestra el desempeño *in vivo* de combinaciones de marco superior seleccionadas ensayadas en tres líneas celulares humanas (HeLa, (negro), Saos-2 (gris oscuro) y HEK 293 (blanco)), mediante la activación de la expresión de luciferasa e ilustradas en comparación con el injerto muy estable de lambda. El control positivo Gal4-VP16 proporciona el nivel máximo posible de activación transcripcional en el sistema. La actividad de la luciferasa se corrigió para la eficacia de la transfección.

45 La Figura 8 representa la resistencia a la agregación a 37°C de combinaciones de marco seleccionadas cuantificadas por la cantidad de proteína monomérica presente antes y después de la incubación, tal como se indica en el regulador PBS. El panel A es representativo de los marcos 2.4 y 5.2 y el panel B para los marcos 4.4, 6.4 y 7.3.

La Figura 9 representa la resistencia a la agregación por degradación por proteasas en suero humano a 37°C de combinaciones de marcos seleccionados, cuantificadas por la cantidad de proteína soluble de longitud completa presente antes y después de una incubación prolongada.

5 La Figura 10 muestra el desempeño *in vivo* de dos aglutinantes seleccionados en el nuevo marco 7.3 en el contexto de Fab, ensayado en un ensayo de interacción de levadura mediante la activación de la expresión de lacZ. La expresión de las cadenas de Fab proviene de un promotor bidireccional inducible por galactosa, ya sea en un vector ars/cen o en uno de 2 micras. La expresión del vector Fab produce la cadena ligera del anticuerpo y una proteína de fusión VH-CH1-Gal4-AD. Los aglutinantes están dirigidos contra la quinasa tipo Polo humana1 (hPLK1). La unión al objetivo se compara con la unión inespecífica a un antígeno no relacionado y la unión del marco no aleatorizado 7.3.
10 Obsérvese que los scFv correspondientes que se han incluido como referencia se expresan a partir de un promotor de actina (2 micras).

15 La Figura 11 muestra el desempeño *in vivo* de los marcos de scFv en el contexto de Fab ensayado por la cantidad de proteína soluble producida en el citoplasma de la cepa de levadura JPY9. La expresión de la fusión Gal4-AD-scFv (actina /2 micras) se compara con la expresión del constructo Fab correspondiente, y con el marco parental 7.3 como un Fab, ambos de dos vectores diferentes (inducible por Gal, ars/cen y 2 micras). La expresión del vector Fab produce la cadena ligera del anticuerpo y una proteína de fusión VH-CH1-Gal4-AD, que se detecta en esta transferencia.

La Tabla 1 muestra un alineamiento de todas las secuencias marco del dominio VH seleccionadas de varios cribados de "control de calidad" en levadura.

20 La Tabla 2 muestra un alineamiento de todas las secuencias marco del dominio VL seleccionadas de varios cribados de "control de calidad" en levadura.

La Tabla 3 muestra un alineamiento de secuencias elegidas al azar de la biblioteca.

25 La Tabla 4 muestra un análisis estadístico de la frecuencia de la subclase para los dominios VH y VL en las secuencias aisladas con el sistema de "control de calidad". Solo se consideraron aquellas secuencias que posteriormente se descubrió que eran positivas en el ensayo cuantitativo de levadura. Las secuencias seleccionadas se comparan con la biblioteca no seleccionada como se determina a partir de un número limitado de secuencias aleatorias (Tabla 3).

La Tabla 5 muestra las secuencias usadas para recombinación adicional y evaluación de las mejores combinaciones en scFv y sus respectivas abreviaturas (abb.), fuentes y subfamilias.

30 Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, predominarán. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.
35

40 Como se usa en el presente documento, "identidad" se refiere a la similitud de secuencia entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad monomérica de base o aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en cada uno de los dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son homólogas en esa posición. El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias coinciden, entonces las dos secuencias tienen 60% de identidad. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten un 50% de homología (se combinan 3 de las 6 posiciones totales). En general, se realiza una comparación cuando dos secuencias se alinean para obtener la máxima homología. Tal alineación puede proporcionarse usando, por ejemplo, el método de Needleman et al., J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970), implementado convenientemente por programas de ordenador tales como el programa Align (ADNstar, Inc.).
45

50 Las secuencias "similares" son aquellas que, cuando están alineadas, comparten residuos de aminoácidos idénticos y similares, donde los residuos similares son sustituciones conservadoras de, o "mutaciones puntuales permitidas" de los correspondientes residuos de aminoácidos en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una "sustitución conservadora" de un residuo en una secuencia de referencia es una sustitución por un residuo que es física o funcionalmente similar al residuo de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño, forma,

- 5 carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Por lo tanto, una secuencia "modificada de sustitución conservadora" es una que difiere de una secuencia de referencia o una secuencia de tipo silvestre en que están presentes una o más sustituciones conservadoras o mutaciones puntuales permitidas. El "porcentaje positivo" entre dos secuencias es una función del número de posiciones que contienen residuos coincidentes o sustituciones conservadoras compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos las secuencias se corresponden y 2 de 10 posiciones contienen sustituciones conservadoras, luego las dos secuencias tienen un 80% de homología positiva.
- "Dominio VH" se refiere a la parte variable de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina.
- 10 "Dominio VL" se refiere a la parte variable de la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina.
- 15 "Subtipo" VH o VL se refiere al subtipo definido por la secuencia consenso respectiva tal como se define en Knappik (2000). El término "subfamilia" o "subclase" se usa como sinónimo de "subtipo". El término "subtipo", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias que comparten un alto grado de identidad y similitud con la secuencia consenso respectiva que representa su subtipo. Si una determinada secuencia de dominio variable pertenece a un "subtipo" se determina mediante el alineamiento de la secuencia con todos los segmentos conocidos de la línea germinal humana del dominio respectivo, o las secuencias de consenso definidas y la posterior identificación de la mayor homología. Los métodos para determinar homologías y agrupar secuencias usando matrices de búsqueda, tales como BLOSUM (Henikoff 1992) son bien conocidos por las personas expertas en la técnica.
- 20 "Secuencia consenso de aminoácidos" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos, que se puede generar usando una matriz de al menos dos o preferiblemente más secuencias de aminoácidos alineadas, y que permite espacios en la alineación, es posible determinar el residuo de aminoácido más frecuente en cada posición. La secuencia consenso es aquella secuencia que comprende los aminoácidos que se representan con mayor frecuencia en cada posición. En el caso de que dos o más aminoácidos estén representados por igual en una sola posición, la secuencia consenso incluye ambos o todos esos aminoácidos.
- 25 La secuencia de aminoácidos de una proteína puede analizarse a diversos niveles. Por ejemplo, la conservación o variabilidad podría exhibirse a nivel de residuo único, nivel de residuo múltiple, residuo múltiple con espacios, etc. Los residuos podrían exhibir la conservación del residuo idéntico o podrían conservarse a nivel de clase. Los ejemplos de clases de aminoácidos incluyen grupos R polares, pero no cargados (serina, treonina, asparagina y glutamina); grupos R cargados positivamente (lisina, arginina e histidina); grupos R cargados negativamente (ácido glutámico y ácido aspártico); grupos R hidrófobos (alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, valina y tirosina); y aminoácidos especiales (cisteína, glicina y prolina). El experto en la técnica conoce otras clases y pueden definirse usando determinaciones estructurales u otros datos para evaluar la posibilidad de sustitución. En ese sentido, un aminoácido sustituible podría referirse a cualquier aminoácido que pudiera ser sustituido y mantener la conservación funcional en esa posición.
- 30 "Secuencia consenso de polinucleótidos" como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de nucleótidos, que puede generarse utilizando una matriz de al menos dos o preferiblemente más secuencias de ácido nucleico alineadas, y permitiendo espacios en la alineación, es posible determinar el nucleótido más frecuente en cada posición. La secuencia consenso es aquella secuencia que comprende los nucleótidos que se representan con mayor frecuencia en cada posición. En el caso de que dos o más nucleótidos estén representados por igual en una sola posición, la secuencia consenso incluye ambos o todos esos nucleótidos.
- 35 "Subelemento estructural" como se usa en el presente documento se refiere a tramos de residuos de aminoácidos dentro de una proteína o polipéptido que corresponden a una parte estructural o funcional definida de la molécula. Estos pueden ser bucles (es decir, bucles de CDR de un anticuerpo) o cualquier otra estructura secundaria o funcional dentro de la proteína o polipéptido (es decir, dominios, hélices α , láminas β , regiones marco de anticuerpos, etc.). Un subelemento estructural puede identificarse usando estructuras conocidas de polipéptidos similares u homólogos, o usando las matrices anteriormente mencionadas de secuencias alineadas de aminoácidos. Aquí la variabilidad en cada posición es la base para determinar los tramos de residuos de aminoácidos que pertenecen a un subelemento estructural (por ejemplo, regiones hipervariables de un anticuerpo).
- 40 "Subsecuencia" como se usa en este documento se refiere a un módulo genético que codifica al menos un subelemento estructural. No es necesariamente idéntico a un subelemento estructural.
- 45 "CDR del Anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo que consisten en los bucles de unión al antígeno como se define por Kabat et al., (1991). Cada uno de los dos dominios variables de un fragmento Fv de anticuerpo contiene, por ejemplo, tres CDR.
- 50

"Anticuerpo" como se usa en este documento es un sinónimo de "inmunoglobulina". Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser inmunoglobulinas enteras o fragmentos de las mismas, que comprenden al menos un dominio variable de una inmunoglobulina, tales como dominios variables individuales, Fv (Skerra, 1988), scFv (Bird, 1988; Huston, 1988), Fab, (Fab')₂ u otros fragmentos bien conocidos por una persona experta en la técnica.

5 "Marco de anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a la parte del dominio variable, VL o VH, que sirve como estructura para los bucles de unión a antígeno de este dominio variable (Kabat et al., 1991).

Los fragmentos scFv modificados racionalmente por ingeniería genética han demostrado una clara correlación entre la estabilidad termodinámica de un fragmento scFv y su desempeño *in vivo* (Worn, 2000; Auf der Maur, 2001). Utilizando un sistema recientemente desarrollado denominado "Control de Calidad" (Auf der Maur, 2001), se han aislado secuencias marco de dominio variable de anticuerpo específico que son adecuadas para aplicaciones intracelulares (tablas 1 y 2), caracterizadas (Figuras 1 y 2) y mejoradas adicionalmente (Figuras 3 a 9 y Tabla 3). Como se observó en nuestros experimentos previos, los marcos bien realizados seleccionados en el ensayo intracelular muestran una alta estabilidad *in vitro* como lo demuestra su resistencia a la agregación y degradación por proteasa a 37°C (Figuras 8 y 9). Por otra parte, surgió un patrón que permite una selección de marcos para aplicaciones intracelulares en una base más general, dependiendo de su subfamilia de marco (Tabla 4). Se describen secuencias de dominio variable de anticuerpo específicas útiles para aplicaciones intracelulares, así como el patrón general. Esto permite, por un lado, el uso de estas secuencias como donantes de marco en experimentos de injerto para obtener intracuerpos funcionales que retienen la especificidad de unión del donante de bucle. Adicionalmente, las bibliotecas de anticuerpos se pueden construir usando las secuencias descritas como marcos. Dichas bibliotecas son adecuadas para sistemas de selección intracelular en condiciones reductoras, tales como aquellas en células procariontas y eucariotas. Adicionalmente, las secuencias descritas pueden usarse para identificar, por ejemplo, secuencias conservadas o residuos o motivos. El injerto de subelementos estructurales, por ejemplo, aquellos de los bucles de unión de un anticuerpo (por ejemplo, Jung, 1997), así como la fabricación de bibliotecas de anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, Vaughan, 1996; Knappik, 2000) ha sido descrito en detalle y es bien conocido por una persona experta en la técnica.

Debido a que las aplicaciones intracelulares exponen los fragmentos de anticuerpo a condiciones muy desfavorables (es decir, temperaturas elevadas, entorno reductor), las secuencias descritas en la presente invención han adquirido características que las hacen resistentes a las condiciones más adversas. Por lo tanto, cuando se compara con secuencias "promedio", las secuencias descritas son de estabilidad y solubilidad sobresalientes como se demuestra por su resistencia a la agregación y a la degradación por proteasas (Figuras 8 y 9). Estas características, junto con su excelente rendimiento de expresión hacen que las secuencias marco de anticuerpo descritas sean únicamente adecuadas no solo para uso intracelular, sino especialmente para todas las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico donde una semivida larga, robustez y facilidad de producción son de gran preocupación.

La presente invención permite el diseño de secuencias polipeptídicas que comprenden al menos la parte variable de un anticuerpo que son útiles para aplicaciones en un entorno reductor o desafiante. Aquí se describe una colección de secuencias marco de anticuerpo útiles para aplicaciones intracelulares (Tabla 1 y 2). En un primer paso, una biblioteca de diversas secuencias se criba independientemente de la afinidad de unión usando el sistema de control de calidad en levadura. Las secuencias aisladas pueden evaluarse por su desempeño intracelular en levaduras y en células de mamíferos (Figuras 1 y 2).

40 Como se describe en este documento, la colección de secuencias aisladas se analiza mediante alineación para identificar las subclases de dominio variable de anticuerpo y secuencias consenso que son adecuadas para aplicaciones intracelulares.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, la colección de secuencias marco de anticuerpo descritas anteriormente se analiza adicionalmente por alineación entre sí y agrupación en subfamilias. Todas las estructuras que pertenecen a un subtipo se comparan con respecto a su desempeño intracelular en levadura y en células de mamífero (Figuras 1 y 2, como ejemplo) y con respecto a la ocurrencia de intercambios negativos, neutros o positivos en su secuencia de aminoácidos relativa a el respectivo subtipo de consenso. Una persona experta en la técnica puede distinguir entre cambios positivos, neutros y negativos en función del entorno estructural del residuo intercambiado particular en el dominio de inmunoglobulina. Posteriormente, se eligen secuencias marco de dominios de anticuerpos variables que muestran el mejor desempeño intracelular y que carecen de intercambios negativos en comparación con sus respectivos subtipos de consenso. Preferiblemente, se seleccionan secuencias que contienen adicionalmente intercambios de aminoácidos que se consideran positivos.

Como se describe adicionalmente en este documento, los dominios variables de anticuerpos seleccionados de las cadenas pesada y ligera se recombinan posteriormente en todas las combinaciones posibles en fragmentos scFv, para identificar las combinaciones con la estabilidad y solubilidad más altas. Para este fin, los fragmentos scFv recombinados nuevos se evalúan por su desempeño en condiciones reductoras en ensayos de interacción intracelular en levadura (Figura 3) y en líneas celulares de mamífero (Figuras 4 y 7) y para expresión intracelular soluble en levadura (Figura 5). Las combinaciones prometedoras se evalúan adicionalmente por su comportamiento

bajo condiciones oxidantes analizando el desempeño de expresión periplasmático en *E. coli* (Figura 6), la resistencia a la agregación a temperaturas elevadas (Figura 8) y la resistencia a la agregación y degradación por proteasas tras incubación prolongada en suero humano a 37°C (Figura 9). Estos datos se usan para identificar el marco de scFv más adecuado para cualquier aplicación específica, ya sea intracelular o en condiciones oxidantes.

- 5 Las secuencias marco seleccionadas y optimizadas descritas en este documento tienen una ventaja significativa no solo en aplicaciones intracelulares, sino en todas las aplicaciones que pueden beneficiarse de una mayor estabilidad y/o solubilidad del scFv. Los ejemplos son el almacenamiento a largo plazo a altas concentraciones requeridas para aplicaciones de diagnóstico, y la semivida funcional prolongada en suero a 37°C (como se requiere, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas).
- 10 De acuerdo con un aspecto, el marco intracuerpo de la presente invención comprende un marco monocatenario que tiene la estructura general:
- NH₂-VL-enlazador-VH-COOH; o
- NH₂-VH-enlazador-VL-COOH
- en donde el marco de VH es del subtipo 1a, 1b o 3.
- 15 En otra realización, la orientación de las regiones VH y VL está invertida en el marco monocatenario descrito anteriormente.
- De acuerdo con un aspecto, el marco intracuerpo de la presente invención comprende un marco monocatenario que tiene la estructura general:
- NH₂-VL-enlazador-VH-COOH; o
- 20 NH₂-VH-enlazador-VL-COOH
- en donde el marco de VH es del subtipo 1a, 1b o 3 y el marco de VL es del subtipo λ1, λ3 o κ1.
- En otra realización, el marco monocatenario de la presente invención se fusiona con un segundo residuo proteico para producir un constructo de fusión de la estructura general:
- NH₂-VL-enlazador-VH-segunda proteína-COOH; o
- 25 NH₂-segunda proteína-VL-enlazador-VH-COOH
- en donde el marco de VH es del subtipo 1a, 1b o 3 y el marco de VL es del subtipo λ1, λ3 o κ1.
- En otra realización, la orientación de las regiones VH y VL en estos constructos de fusión puede invertirse.
- En otra realización, los dominios variables pueden incorporarse en un fragmento Fab que se puede fusionar adicionalmente a un segundo residuo proteico para producir constructos de fusión de la estructura general:
- 30 NH₂-VH-CH-segunda proteína-COOH y NH₂-VL-CL-COOH
- La segunda proteína se puede fusionar con el extremo terminal C ya sea de la cadena pesada o la cadena ligera.
- Como se describe en el presente documento, existe una preferencia muy fuerte en aplicaciones intracelulares para el marco de VH del subtipo 3, pero también para 1a y 1b. Con respecto al dominio variable de cadena ligera (VL), hay una clara preferencia por los números para los marcos del tipo kappa 1, pero lambda 1 y 3 también están enriquecidos. Estos subtipos de marco, es decir, VH 1a, 1b y 3 combinados con un dominio VL kappa 1, lambda 1 o 3 son por lo tanto más adecuados para el uso intracelular y otras aplicaciones que requieren las propiedades de plegamiento del scFv. Por lo tanto, para reducir la cantidad de moléculas que no son funcionales en el entorno reductor, las bibliotecas para sistemas de cribado intracelular deberían construirse preferencialmente a partir de una mezcla de estos subtipos de marco.
- 35
- 40 En una realización preferida, el dominio VH de los fragmentos de anticuerpo de la invención es del subgrupo 1a, 1b o 3.

En una realización preferida, el dominio VL de los fragmentos de anticuerpo de la invención es del subgrupo kappa1, lambda 1 o 3.

5 Como se describe en este documento, los fragmentos de anticuerpo usados como marcos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3, 7.3, 1.4, 2.4, 3.4, 4.4, 5.4 y 6.4 como se describe en la Tabla 5.

10 Pueden identificarse al menos dos y también más marcos y luego analizarse. Se puede establecer una base de datos de las secuencias de proteínas donde las secuencias de proteínas se alinean entre sí. La alineación puede usarse entonces para definir, por ejemplo, residuos, subelementos, subsecuencias o subgrupos de secuencias de marco que muestran un alto grado de similitud tanto en la secuencia como, si esa información está disponible, en la disposición estructural.

La longitud de los subelementos oscila preferiblemente, pero no exclusivamente, entre 1 aminoácido (tal como un residuo en el sitio activo de una enzima o un residuo determinante de la estructura) y 150 aminoácidos (por ejemplo, dominios de proteína completa). Lo más preferiblemente, la longitud varía entre 3 y 25 aminoácidos, tal como la más comúnmente encontrada en bucles de CDR de anticuerpos.

15 Se pueden sintetizar secuencias consenso de ácido nucleico, que se predicen a partir del análisis. Esto se puede lograr mediante uno cualquiera de varios métodos bien conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante síntesis génica total o mediante enfoques basados en PCR.

20 Las secuencias de ácido nucleico se pueden clonar en un vector. El vector podría ser un vector de secuenciación, un vector de expresión o un vector de visualización (por ejemplo, presentación en fagos), todos los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un vector podría comprender una secuencia de ácido nucleico, o dos o más secuencias nucleicas, en diferentes o el mismo operón. En el último caso, podrían clonarse por separado o como secuencias contiguas.

25 Los polipéptidos pueden tener un patrón de aminoácidos característico de una especie particular. Esto puede lograrse, por ejemplo, deduciendo las secuencias consenso de una colección de proteínas homólogas de una sola especie, más preferiblemente de una colección de proteínas humanas.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a proteínas de fusión al proporcionar una secuencia de ADN que codifica tanto el polipéptido, como se describió anteriormente, como también un residuo adicional.

30 Se describen adicionalmente en la presente memoria secuencias de ácidos nucleicos, vectores que contienen las secuencias de ácidos nucleicos, células huésped que contienen los vectores, y polipéptidos obtenibles de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

La síntesis o colocación de sitios de restricción al final de las secuencias de ácido nucleico de la invención permite que se clonen en vectores adecuados.

35 Además, en este documento, se describen sistemas de vectores que son compatibles con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos. Los vectores comprenden sitios de restricción, que serían, por ejemplo, únicos dentro del sistema de vector y esencialmente únicos con respecto a los sitios de restricción incorporados en las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, excepto por ejemplo los sitios de restricción necesarios para clonar las secuencias de ácido nucleico en el vector.

40 También se describe aquí un kit, que comprende una o más de la lista de secuencias de ácidos nucleicos, vectores recombinantes, polipéptidos y vectores de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, y, por ejemplo, células hospedadoras adecuadas para producir los polipéptidos.

Todas las realizaciones anteriores de la presente invención pueden efectuarse usando técnicas estándar de biología molecular conocidas por los expertos en la técnica.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico es cualquier secuencia capaz de codificar los polipéptidos de la invención.

45 En otra realización, los ácidos nucleicos de la invención se usan en terapia génica.

Como se describe en este documento, el marco monocatenario puede ser una variante de cualquiera de las secuencias 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3, 7.3, 1.4, 2.4, 3.4, 4.4, 5.4, 6.4 (Tabla

5), donde la "variante" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia que exhibe una identidad del 90% o superior, mientras se mantiene una estabilidad mejorada.

5 Como se describe adicionalmente en este documento, el marco monocatenario puede ser un derivado de cualquiera de las secuencias 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3, 7.3, 1.4, 2.4, 3.4, 4.4, 5.4, 6.4 (Tabla 5) donde "derivado" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia que mantiene solo aquellos aminoácidos que son críticos para la función y estabilidad de la molécula. Los intercambios neutros o positivos aislados en el marco como se describe en el ejemplo 3, no se consideran cambios relevantes en las estructuras de anticuerpos de la presente invención.

10 En una realización preferida de la invención, el marco monocatenario se fusiona con una segunda proteína, en la que dicha proteína proporciona una lectura para los ensayos intracelulares. La lectura puede ser directa, por ejemplo, en forma de una fusión a una proteína detectable, por ejemplo, GFP (proteína fluorescente verde), proteína fluorescente azul mejorada, fluorescente amarillo mejorada, proteína fluorescente cian mejorada que se puede observar por fluorescencia u otros compañeros de fusión con diferentes métodos de detección. Alternativamente, se puede lograr una lectura a través de la activación transcripcional de un gen informador, donde el compañero de fusión en la proteína de fusión scFv es un activador transcripcional, tal como el dominio de activación Gal4 o una proteína de unión al ADN, tal como el Dominio de unión a ADN LexA o Gal4, que activa la transcripción de un gen informador de una enzima, tal como β -galactosidasa, luciferasa, α -galactosidasa, β -glucuronidasa, cloranfenicol acetil transferasa y otros, que a su vez proporcionan una lectura. Las proteínas de fusión, que proporcionan una lectura son bien conocidas por los expertos en la técnica.

20 Otra realización de la invención es un anticuerpo que comprende un marco de la invención.

Otra realización de la invención es el uso del anticuerpo de la presente invención.

Las clases descritas de marcos de dominios variables de anticuerpos y secuencias de dominios variables y scFv se pueden usar para el injerto de bucles hipervariables a partir de anticuerpos existentes, con el fin de obtener anticuerpos que son funcionales en un entorno reductor o desafiante.

25 Las clases de marco descritas de dominios variables de anticuerpos y secuencias de dominios variables y scFv también se pueden usar, por ejemplo, mediante la aleatorización de uno o más de los bucles hipervariables de dichos marcos, para la creación de bibliotecas para aplicaciones en un ambiente reductor o desafiante.

Como sería evidente para un experto habitual en la técnica, las moléculas de la invención descritas en este documento se pueden usar en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, validación de objetivos y terapia génica.

30 La invención se puede ilustrar mediante los siguientes ejemplos, que no están destinados a limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

35 Selección de marcos de intracuerpos mediante el cribado de una biblioteca humana en el sistema de "control de calidad" en levaduras

El cribado con el sistema de "control de calidad" para marcos estables se realizó esencialmente como se describe en detalle por Auf der Maur (WO 0148017, Auf der Maur 2001).

40 Los plásmidos para la expresión de los constructos de fusión de scFv para el cribado en levaduras se derivaron de pESBA-Act (Worn, 2000). Contiene el gen TRP1 de levadura para la selección de transformación en *S. cerevisiae* y el origen de replicación de 2 micras para asegurar alto número de copias. Además, tiene un promotor constitutivo de actina para la expresión fuerte y la secuencia de terminación de la transcripción GAL11, separadas por un sitio de clonación múltiple. Para el manejo en sistemas bacterianos, también tiene un origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a amp.

45 El dominio de activación Gal4 (aminoácidos AD 768-881) se amplificó originalmente mediante PCR usando pGAD424 (Clontech) como molde con cebadores que incluyen la señal de localización nuclear del antígeno T de SV40 en el extremo terminal N para el Gal4-AD. Los fragmentos de ADN que codifican los aminoácidos 263-352 de Gal11P se amplificaron mediante PCR y se clonaron en marco, en el extremo terminal N para el constructo SV40-NLS-Gal4-AD. La biblioteca de scFv humano, amplificada a partir de ADnc de células de bazo humano como se describe en otra parte (Welschhof, 1995; Krebber, 1997; de Haard, 1999), se clonó en el marco extremo terminal N a

este constructo de fusión a través de sitios Sfil, y en la orientación VL-enlazador-VH donde el enlazador tiene la secuencia (GGGS)₄. Por lo tanto, la expresión produce una proteína de fusión de la estructura general scFv-Gal11p-SV40 NLS-Gal4AD.

5 El cribado se llevó a cabo en las cepas de levadura YDE172 de *S. cerevisiae* (*MAT ura3-52 leuΔ1 trp1Δ63 his3Δ200lys2Δ 385 gal4Δ 11*) (Auf der Maur, 2001), que se deriva de la cepa JPY9 (Escher, 2000) mediante la integración de los genes informadores LacZ y HIS3 orientados de forma divergente bajo el control de UAS_C natural de las secuencias reguladoras de Gal1-GAL10 en el locus *his3Δ200*. La activación transcripcional del sistema indicador está mediada por el residuo Gal4-AD del constructo de fusión scFv, después de la interacción específica de su residuo Gal11P con el dominio de unión a ADN Gal4 (DBD, aminoácidos 1-100). El Gal4-DBD es proporcionado por la expresión de un segundo plásmido, pMP83. Contiene el gen LEU2 de levadura para la selección de transformación en *S. cerevisiae* y el origen de replicación ARS CEN. Además, tiene un promotor constitutivo de actina para expresión fuerte y la secuencia de terminación transcripcional GAL11. Para el manejo en sistemas bacterianos, también tiene un origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a amp.

15 Para el cribado, la cepa de levadura YDE172 de *S. cerevisiae* se cotransformó con una biblioteca de scFv como construcción de fusión sobre el vector pESBA-Act2, mientras que el vector pMP83 proporcionó el Gal4-DBD. Se usó un protocolo de transformación de acetato de litio estándar (Agatep, 1998). Después de la transformación, las células se sembraron en placa en placas de (-Trp/-Leu/-His) que contienen 3-aminotriazol 80 mM. Las colonias se recogieron después de 3 días de incubación a 30°C y se volvieron a sembrar en placas de eliminación (-Trp/-Leu/-His) que contenían 3-aminotriazol 80 mM. Aquellas colonias que volvieron a crecer se analizaron para determinar la expresión de LacZ mediante el desarrollo de color azul en un ensayo de filtro en placas que contenían el sustrato X-Gal. Se tomaron clones positivos para un análisis adicional que implica el aislamiento del plásmido que porta scFv de levadura, la transformación en DH5α de *E. coli*, el aislamiento del plásmido a partir de colonias individuales de *E. coli* y la re-transformación en cepas de levadura recién preparadas YDE172 de *S. cerevisiae* para el ensayo como se describe a continuación. Todos los métodos se realizaron de acuerdo con procedimientos estándar, bien conocidos por una persona experta en la técnica.

25 Además, se usó un procedimiento modificado de cribado en el que el scFv se fusionó directamente tanto con un dominio de unión al ADN (LexA, aminoácidos 1-202) como con un dominio de activación (Gal4, aminoácidos 768-881) para producir un constructo de fusión de la siguiente estructura: scFv-LexA-NLS-Gal4AD. Los plásmidos para la expresión de los constructos de fusión de scFv para el cribado en levadura se derivaron de pESBA-Act2. Contiene el gen TRP1 de levadura para la selección de transformación en *S. cerevisiae* y el origen de replicación de 2 micras para asegurar alto número de copias. Además, tiene un promotor constitutivo de actina (para expresión fuerte) y la secuencia de terminación transcripcional GAL11 separada por un sitio de clonación múltiple. Para el manejo en sistemas bacterianos, también tiene un origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a la amp.

35 El cribado se llevó a cabo en la cepa de levadura Immuna LHB de *S. cerevisiae* (*MATα ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 lys2Δ 385*) que se derivó de la cepa JPY5 integrando los genes informadores LacZ y HIS3 orientados de forma divergente bajo el control de un promotor bidireccional con seis sitios de unión a LexA (plásmido informador integrante pDE200, Escher 2000) en el locus *his3Δ200* y mediante la integración del gen informador LEU2 bajo el control de un promotor con ocho sitios de unión a LexA (derivados de EGY48) en el locus *leu2Δ1*. La activación transcripcional del sistema informador está mediada por el residuo Gal4-AD del constructo de fusión scFv. El cribado se llevó a cabo esencialmente como se describió anteriormente usando un medio de eliminación (-Trp/-Leu/-His) y concentraciones de 3-aminotriazol de hasta 40 mM.

Ejemplo 2

Evaluación del desempeño *in vivo*

a) en levadura

45 Para el análisis cuantitativo del desempeño de los marcos seleccionados en levadura (Figuras 1 y 3), se transformó la cepa Immuna LHB de *S. cerevisiae* con los scFv aislados como constructos de fusión LexA-Gal4-AD en el vector pESBA-Act2 siguiendo un protocolo de transformación estándar con acetato de litio (Agatep, 1998). Después de la transformación, las células se sembraron en placa sobre placas de eliminación (-Trp). Se inocularon 2 mL de cultivos durante la noche en medio de eliminación (-Trp) por duplicado a partir de vetas que contenían varias colonias y se cultivaron a 30°C. Los cultivos se diluyeron en 1 mL de medio de eliminación (-Trp) a una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0,7. Luego se cultivaron a 30°C durante 2 h. Para el ensayo, se tomaron 100 μL de cultivo celular, se mezclaron con 900 μL de regulador, 45 μL de cloroformo y 30 μL de SDS al 0,1%, se sometieron a agitación tipo vórtice y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. El desarrollo del color se inició mediante la adición de 0,2 mL de ONPG (4 mg/mL) y se detuvo con 0,5 mL de Na₂CO₃ (1 M). La actividad se calculó teniendo en cuenta la OD600 del cultivo de ensayo, así como el tiempo de incubación del desarrollo de color y el volumen de cultivo utilizado.

- Los clones que fueron al menos iguales o mejores que el control positivo (el injerto lambda muy estable descrito anteriormente (Worn, 2000; Auf der Maur, 2001)) se secuenciaron para identificar el subtipo de marco (definiciones de subtipo de marco de acuerdo con TomLinson, (1992), Cox, (1994) y Williams, (1996)). La secuenciación reveló una preferencia sorprendente por ciertos subtipos de marcos. Para el dominio variable de cadena pesada (VH), los subtipos de estructura 2 y 6 nunca se encontraron y 4 se redujo marcadamente entre los clones positivos. Corregida por el desempeño de las secuencias aisladas en el ensayo intracelular de levadura, existe una preferencia muy fuerte por el marco de VH del subtipo 3, pero también por 1a y 1b en aplicaciones intracelulares. Con respecto al dominio variable de cadena ligera (VL), existe una clara preferencia por los marcos de los subtipos kappa 1, lambda 1 y lambda 3 (Tabla 4).
- Estos subtipos de marco, es decir, VH1a, 1b y 3 combinados con un dominio VL kappa1, lambda1 y lambda3 son, por lo tanto, más adecuados para el uso intracelular y otras aplicaciones con requisitos rigurosos relativos a las propiedades de plegamiento del scFv. Las bibliotecas para sistemas de cribado intracelular deberían, por ejemplo, construirse preferiblemente a partir de una mezcla de estos subtipos de marco solamente, para reducir la cantidad de moléculas que no son funcionales en el entorno reductor.
- b) en células de mamífero

Se usó la línea de células HeLa para el análisis cuantitativo del desempeño de los marcos seleccionados en células humanas (Figuras 2, 4 y 7). El gen informador de luciferasa se proporcionó a partir de un plásmido informador pGL3 (Promega) cotransfectado que contiene la luciferasa bajo el control del UAS Gal4 natural. Los vectores de expresión de mamíferos usados para la transfección transitoria contienen el Gal4 (1-147) fusionado en el extremo terminal C al VP16-AD bajo el control de un promotor de CMV. Los scFv aislados se clonaron en marco, en el extremo terminal C con una fusión de Gal4 (1-147)-VP16 para producir una proteína de fusión Gal4 (1-147)-VP16-scFv tras la expresión. Las células se cultivaron en DMEM complementado con FCS al 2,5% y 1-glutamina 2 mM. Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo de Polyfect (Qiagen) en placas de cultivo tisular de 60 mm usando 0,01-0,1 µg del vector que contiene el constructo de scFv, 0,5 µg de un plásmido de expresión Gal4 (1-147)-VP16 accionada por el promotor de CMV y 0,5 µg de un vector de expresión LacZ como referencia para la eficacia de la transfección. Las células se recogieron 24-48 horas después de la transfección, se resuspendieron en 1.000 µL de regulador y se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación. El lisado celular se centrifugó y el sobrenadante se ensayó para determinar la actividad de luciferasa usando solución de ensayo de luciferasa (Promega) y para actividad de LacZ de acuerdo con el protocolo estándar. La actividad de luciferasa obtenida se corrigió con la actividad de LacZ para tener en cuenta la variación en la eficacia de la transfección.

Ejemplo 3

Alineación múltiple y análisis de la comparación de secuencia

- Para elucidar el patrón general de las secuencias marco adecuadas para aplicaciones intracelulares, se aislaron todos los clones positivos (es decir, los que crecen en condiciones selectivas en el sistema de control de calidad) y se secuenció la parte que codifica los scFv. Posteriormente, las secuencias de scFv se dividieron en sus componentes de cadena ligera y pesada para permitir la alineación de los dominios respectivos (Tablas 1 y 2) según el esquema de numeración ajustado estructural de los dominios de inmunoglobulina por Honegger (2001).
- Para permitir la evaluación de los datos obtenidos, se generó un alineamiento que representa la biblioteca no seleccionada (Tabla 3). Con el fin de obtener secuencias no seleccionadas, la biblioteca se transformó en células de *E. coli* que no expresan los genes de scFv y los clones se seleccionaron al azar para el aislamiento del plásmido y la secuenciación de la secuencia de scFv. La biblioteca cubre el repertorio de anticuerpos humanos como se esperaba y, por lo tanto, no tiene sesgo hacia subgrupos específicos, aparte de lo esperado por el patrón de expresión generalmente encontrado en humanos.
- Las secuencias de VH y VL se agruparon de acuerdo con su subgrupo. Se destacaron los cambios en la secuencia consenso específica de subgrupo. Una persona experta en la técnica puede distinguir entre cambios positivos, neutros y negativos en función del entorno estructural del residuo particular intercambiado (por ejemplo, Honegger, 2001). Un intercambio de un residuo perteneciente a un grupo particular de aminoácidos con un residuo del mismo grupo se valida en general como un intercambio neutral. Un intercambio de un residuo que pertenece al grupo de aminoácidos hidrófobos que apuntan al núcleo hidrofóbico de la proteína con un aminoácido del grupo de aminoácidos polares, pero no cargados o cargados positivamente o negativamente sería altamente desfavorable porque los sitios donadores/aceptores de hidrógeno insatisfechos perturban el embalaje apretado del núcleo hidrofóbico. Tal cambio se considera negativo. El intercambio de un residuo perteneciente al grupo de residuos polares, pero no cargados en la superficie del dominio de inmunoglobulina con un aminoácido del grupo de residuos cargados positiva o negativamente es altamente favorable a medida que aumenta la solubilidad de la proteína. Tal cambio, por lo tanto, se valida positivamente, mientras que el intercambio de un residuo polar a uno hidrofobo es

altamente desfavorable a medida que disminuye la solubilidad de la proteína y, por lo tanto, se valida negativamente. En las posiciones con un ángulo ϕ positivo conservado, el intercambio de cualquier aminoácido con glicina se valida positivamente mientras que un intercambio de glicina con cualquier aminoácido se valida negativamente porque la glicina es el único aminoácido que puede formar un ángulo ϕ positivo. La pérdida de un puente salino conservado entre las posiciones 45 - 53, 45 - 100, 77 - 100 y 108 - 137 debido a un intercambio de un aminoácido del grupo de residuos con carga positiva o negativa por un aminoácido sin carga da como resultado la disminución de la estabilidad termodinámica y, por lo tanto, se considera negativo.

Finalmente, elegimos 7 dominios VL y 4 dominios VH que se seleccionaron preferiblemente durante el control de calidad (es decir, que mostraban los intercambios menos negativos y más positivos de la secuencia consenso y cubren los subgrupos) y que cada uno muestra un alto desempeño *in vivo* en levadura. Las secuencias se resumen en la Tabla 5 e incluyen dos Vk1 (k I 27 (1.x) y k III 25(2.x)), dos Vk3 (k IV 103 (3.x) y k IV 135 (5.x)), un V λ 1 (k IV 107 (4.x)), dos V λ 3 (a33 (7.x) y a43 (6.x)), un VH1b (a33 (x.3)) y tres VH3 (a fw10 (x.2), a43 (x.4) y a44 (x.1)). Estos dominios VL y VH se mezclaron dando 22 nuevas combinaciones en el formato scFv (1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3, 7.3, 1.4, 2.4, 3.4, 4.4, 5.4, 6.4).

15 **Ejemplo 4**

Evaluación del desempeño *in vivo* de dominios mezclados

a) Desempeño en un ensayo intracelular en células de levadura y mamífero

Las 22 combinaciones se ensayaron para su desempeño *in vivo* en células de levadura y mamífero como se describe en el ejemplo 2 (Figuras 3 y 4).

20 b) Expresión de proteína soluble en condiciones reductoras en levadura

Para comparar los rendimientos de la proteína soluble tras la expresión en condiciones reductoras, los marcos seleccionados se expresaron como una fusión a Gal4 AD en el citoplasma de levadura *S. cerevisiae*. Los constructos de fusión en el vector pESBA-Act2 tenían la estructura general Gal4 AD-scFv. Se transformaron como se describió anteriormente en la levadura cepa JPY9 de *S. cerevisiae* y sembraron en placa en palcas de deserción - Trp.

Se inocularon 5 mL de cultivos de una noche en medio de eliminación (-Trp) a partir de vetas que contenían varias colonias y se cultivaron a 30°C. Los cultivos se diluyeron en medio de eliminación de 50 mL (-Trp) hasta una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0,5. Se cultivaron a 30°C durante 5 h. Para el extracto de células nativas, se recogieron 2,5 mL de cultivo celular normalizado a una OD600 de 3 por centrifugación, se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se resuspendieron en 75 μ L de Y-PER (Pierce) que contenía inhibidor de proteasa (PMSF). El sedimento celular resuspendido se agitó brevemente en vórtice y se incubó (agitando ligeramente) a 20°C durante 20 minutos. El material insoluble y agregado se sedimentó a velocidad máxima en una centrifuga Eppendorf a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con colorante de carga, se calentó a 100°C durante 5 min y se separó en SDS-PAGE al 12%. Los constructos de fusión Gal4 AD-scFv solubles se visualizaron mediante transferencia Western mediante detección del residuo Gal4 con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Gal4AD (Santa Cruz Biotechnology) como un anticuerpo primario y un conjugado anti-peroxidasa de ratón (Sigma) como anticuerpo secundario y usando un sustrato quimioluminiscente (Pierce) (Figura 5). Los procedimientos de SDS-PAGE y transferencia Western son bien conocidos por una persona experta en la técnica.

c) Comportamiento de expresión en el periplasma de *E. coli*

Para la evaluación del comportamiento de expresión periplasmático en *E. coli* (Figura 6), se clonaron marcos de scFvs aislados en un vector bacteriano que alberga el gen de resistencia a la cam (*catR*) y el gen represor *lacI* (Krebber, 1997), con una secuencia líder de *peIB* del extremo terminal N y una etiqueta his en el extremo terminal C bajo el control del promotor/operador *lac*. Las cepas competentes JM83 de *E. coli* se transformaron con estos plásmidos. Se inocularon con 50 mL de medio dYT que contenía 35 mg/L de cloranfenicol en matraces agitados 1:40 con un cultivo durante la noche y se incubaron a 30°C. Las células se indujeron a una OD600 de 0,8 con IPTG 1 mM y se recogieron después de 3 horas de inducción mediante centrifugación. El sedimento se resuspendió en Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM y se normalizó a una OD600 de 10. Las muestras de cada uno de los fragmentos scFv se analizaron directamente (extracto total) o después de la sonicación seguida de centrifugación (fracción soluble) mediante SDS-PAGE. La cantidad de proteína soluble se estimó a partir del gel teñido con Coomassie.

50 **Ejemplo 5**

Evaluación detallada de 5 combinaciones con propiedades superiores para uso extracelular

Se eligieron cinco combinaciones como ejemplos que muestran un buen desempeño tanto en ensayos intracelulares de levadura como de mamíferos, rendimiento de proteína soluble durante la expresión en levadura y *E. coli*, y que cubren los subgrupos que se seleccionaron preferiblemente durante el control de calidad (2.4, 4.4, 5.2, 6.4 y 7.3, véase Tabla 5 para más detalles). Analizamos estas combinaciones en mayor detalle para evaluar mejor su uso en condiciones reductoras y oxidantes.

a) Desempeño en un ensayo intracelular en diferentes células de mamíferos

El análisis cuantitativo del desempeño de las cinco combinaciones en células humanas se llevó a cabo usando células HeLa y además usando la línea celular de osteosarcoma humano Saos-2 y la línea celular de riñón embrionario humano HEK293 como se realizó en el Ejemplo 2 (Figura 7).

b) Rendimiento *in vitro*

Expresión y purificación

Para la evaluación del desempeño *in vitro*, las cinco combinaciones superiores se expresaron en el periplasma de *E. coli* (Figura 6). Se inoculó una cantidad de 0,1 de medio dYT que contenía 35 mg/L de cloranfenicol en matraces de agitación 1:40 con un cultivo durante la noche y se incubó a 30°C. Las células se indujeron a una OD550 de 1,5 con IPTG 1 mM y se recogieron después de 2 horas de inducción mediante centrifugación. Para la purificación de los scFv, el sedimento celular se resuspendió y se sometió a lisis por sonicación. Después de la centrifugación en SS34 a 20 krpm, 4°C durante 30 minutos, el sobrenadante se aplicó a una columna de afinidad Ni-MC (HP quelante, HiTrap^{MR} 1 mL, Amersham Pharmacia) a pH 7,5 y se eluyó con 200 mM de imidazol usando un sistema Akta Basic de Amersham Pharmacia. La pureza de los fragmentos scFv fue mayor al 98% según se determinó mediante SDS-PAGE (datos no mostrados). La concentración de la proteína purificada se determinó usando el coeficiente de extinción calculado a 280 nm. El rendimiento de proteína purificada soluble se normalizó a un volumen de cultivo de 1 L con una OD600 de 10 y varió de 8 a más de 55 mg.

Resistencia a la agregación

Se ha demostrado que la resistencia a la agregación se correlaciona con la estabilidad termodinámica (Worn, 1999) *in vitro* y la eficacia de la localización del tumor en un modelo de tumor xenoinjertado en ratones (Willuda, 1999). Con el fin de evaluar la estabilidad, la resistencia a la agregación y la reversibilidad del desplegamiento, se mantuvieron muestras de 200 µL de las proteínas purificadas a concentraciones de 6 µM en Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM durante 4 días a 4°C o 4 días a 37°C o 3 días a 4°C seguido de incubación de 15 o 60 minutos a 100°C, enfriamiento lento a temperatura ambiente y una incubación durante la noche a 4°C. El estado oligomérico de cada muestra se analizó posteriormente en una columna de filtración en gel equilibrada con Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM para estimar la cantidad de material agregado frente al monomérico (Figura 8). Las proteínas se inyectaron en una columna Superdex-75 (Amersham Pharmacia) en un volumen de 100 µL y una velocidad de flujo de 1 mL/min en un sistema Akta Basic (Amersham Pharmacia).

Resistencia a la degradación por proteasa

Para determinar la estabilidad de los marcos aislados frente a la degradación por proteasa, un parámetro que es importante para aplicaciones terapéuticas, se incubaron los marcos purificados en suero humano a 37°C (Figura 9).

Se diluyó 10 veces proteína de scFv purificada marcada con his (véase más arriba) a una concentración de 50 µM en suero humano hasta una concentración final de 5 µM en suero al 90%. A continuación, las muestras se incubaron a 37°C durante 3 días o 1 día o se tomaron directamente para la carga. Antes de cargar, el material insoluble y agregado se sedimentó a velocidad máxima en una centrífuga Eppendorf a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se diluyó seis veces con un colorante de carga para reducir la cantidad de suero cargado en el gel, se calentó a 100°C durante 5 minutos y se separó en SDS-PAGE al 12%. Los fragmentos scFv solubles marcados con his se visualizaron por transferencia Western mediante detección de la etiqueta his con un anticuerpo de ratón anti-his monoclonal (Qiagen) como anticuerpo primario y un conjugado anti-peroxidasa de ratón (Sigma) como anticuerpo secundario y utilizando un sustrato quimioluminiscente. (Pierce). Los procedimientos SDS-PAGE y transferencia Western son bien conocidos por una persona experta en la técnica.

Ejemplo 6

Selección de aglutinantes de antígeno mediante el cribado de una biblioteca de CDR aleatorizada en el marco 7.3 en el sistema de interacción de cribado en levadura

El cribado con el sistema de interacción para los aglutinantes de antígeno se realizó esencialmente como se describió en detalle anteriormente (Auf der Maur, 2002).

Los plásmidos para la expresión de los constructos de fusión de scFv para el cribado en levaduras se derivaron de pESBA-Act2. Contiene el marcador nutricional TRP1 de levadura y el origen de replicación de 2 micras. Además, tiene un promotor constitutivo de actina para la expresión fuerte y la secuencia de terminación de la transcripción GAL11, separados por un sitio de clonación múltiple. Para el manejo en sistemas bacterianos, también tiene un origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a la amp.

El dominio de activación Gal4 (AD, aminoácidos 768-881) se amplificó originalmente mediante PCR usando pGAD424 (Clontech) como molde con cebadores que incluyen la señal de localización nuclear del antígeno T de SV40 en el extremo terminal N a Gal4-AD. La biblioteca de scFv se obtuvo por amplificación por PCR del marco 7.3 de scFv usando cebadores que aleatorizan 7 aminoácidos dentro de la CDR3 de VH. El producto de PCR resultante se clonó en el marco 7.3, presente en el vector en la orientación VL-enlazador-VH, como una fusión en el extremo terminal C para Gal4-AD. Por lo tanto, la expresión produce una proteína de fusión de la estructura general Gal4-AD-scFv.

La selección se llevó a cabo en las cepas de levadura Immuna LHB de *S. cerevisiae* (*MAT α ura3-52 leu2 Δ 1 trp1d63 his3 Δ 200 lys2 Δ 385*). Se derivó de la cepa JPY5 integrando los genes informadores *LacZ* y *HIS3* orientados de forma divergente bajo el control de un promotor bidireccional con seis sitios de unión a LexA (integrando el plásmido informador pDE200, Escher 2000) en el locus *his3 Δ 200* e integrando el gen informador LEU2 bajo el control de un promotor con ocho sitios de unión a LexA (derivados de EGY48) en el locus *leu2 Δ 1*.

La activación transcripcional del sistema informador está mediada por el residuo Gal4-AD del constructo de fusión de scFv, después de la interacción específica de su residuo de scFv con el residuo de antígeno de la proteína de fusión de cebo. La proteína de fusión de cebo consiste del dominio quinasa del extremo terminal C fusionado a la quinasa I similar a polo humano 1 (hPlk1-KD) a la proteína LexA de unión a ADN. El dominio quinasa (aminoácidos 2-332) se amplificó por PCR a partir de un ADNc de hPlk1 usando el cebador en dirección 5', 5'-tgctctagaagt gctgcagt gactgcag-3' (SEQ ID No. 12) y el cebador en dirección 3', 5'-ggttgcgacttacaggctgctggagcaatcg-3' (SEQ ID No.13). El producto PCR resultante se clonó en el extremo terminal C de LexA a través de *Xba*I y *Sal*I en el vector cebo. El vector cebo contiene el marcador nutricional URA3 y un origen de replicación de Ars Cen. La expresión de la proteína de fusión de cebo es impulsada por un promotor de actina constitutivamente activo. La transcripción finaliza mediante la secuencia de finalización GAL11. El vector cebo también tiene un origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a amp para propagación en sistemas bacterianos.

Para cribado, se cotransformó la cepa de levadura Immuna LHB de *S. cerevisiae* con una biblioteca de scFv como fusión a Gal4-AD en el vector pESBA-Act2 y el vector cebo proporcionando la fusión LexA-hPLK1-KD siguiendo un protocolo de transformación estándar con acetato de litio (Agatep, 1998). Después de la transformación, las células se sembraron en placa en placas de eliminación (-Trp /-Leu /-Ura). Las colonias se recogieron después de 3 a 5 días de incubación a 30°C y se volvieron a sembrar en placas de eliminación (-Trp/-Leu/-Ura). Aquellas que volvieron a crecer se analizaron para determinar la expresión de LacZ mediante el desarrollo de color azul en un ensayo de filtro en placas que contenían el sustrato X-Gal. Se tomaron clones positivos para un análisis adicional que implica el aislamiento del plásmido que porta scFv de levadura, transformación en *E. coli* DH5 α , aislamiento del plásmido de colonias individuales de *E. coli*, secuenciación y nueva transformación en cepas de levadura recién preparadas Immuna LHB de *S. cerevisiae* para el ensayo como se describe a continuación. Todos los métodos se realizaron de acuerdo con procedimientos estándar, bien conocidos por una persona experta en la técnica.

Ejemplo 7

Evaluación del desempeño *in vivo* de constructos de Fab derivadas de nuevos marcos de scFv

Para evaluar el efecto beneficioso de usar marcos estables de dominio variable en diferentes formatos de anticuerpo, se construyó el vector de expresión Fab para uso en el cribado de interacción de levadura.

a) Constructos Fab para el cribado intracelular en levadura

Se construyeron dos vectores de expresión diferentes para permitir diferentes niveles de expresión. Los vectores se basan en las cadenas principales y Eplac 112 (2 micras) o yCplac22 (ars/cen) (Gietz, 1988). Ambas contienen el marcador nutricional TRP1 de levadura, un promotor Gal1/Gal10, bidireccional inducible, un origen de replicación bacteriano y el gen de resistencia a amp para el manejo en sistemas bacterianos. En una dirección, se clonó el dominio VH del marco 7.3 en el extremo terminal N al dominio CH1 de IgG1 que incluye la cisteína del extremo terminal C, seguido por un enlazador y el dominio de activación Gal4 (AD, aminoácidos 768-881) incluyendo el antígeno T de SV40. Por otro lado, el dominio VL del marco 7.3 se clonó en el extremo terminal N al dominio CL (λ) que incluye la cisteína del extremo terminal C. Los terminadores son el terminador Gal11 en el lado de la cadena pesada y el terminador Ciclina 1 en el lado de la cadena ligera.

b) Desempeño en un ensayo intracelular en levadura

5 Para el análisis cuantitativo del desempeño de los aglutinantes de antígeno en formato scFv y Fab en levadura (Figuras 1 y 3), se cotransformó la cepa Immuna LHB de *S. cerevisiae* con los scFv aislados como constructos de fusión Gal4-AD en el vector pESBA-Act2 y el vector cebo que contiene la fusión LexA-hPLK1-KD siguiendo el protocolo de transformación estándar con acetato de litio (Agatep, 1998). Después de la transformación, se sembraron en placas las células en placas de eliminación (-Trp, -Ura, -Glc). Se inocularon 2 mL de cultivos durante la noche en medio de eliminación (-Trp, -Ura, -Glc) por duplicado a partir de vetas que contenían varias colonias y se cultivaron a 30°C. Los cultivos se diluyeron en 1 mL de medio de eliminación (-Trp, -Ura, -Gal) a una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0,7. Se cultivaron a 30°C durante 5 h. El ensayo se llevó a cabo como se describió anteriormente.

10 c) Expresión de proteína soluble en condiciones reductoras en levadura

Para comparar los rendimientos de la proteína soluble tras la expresión en condiciones reductoras, los constructos scFv y Fab, junto con el vector cebo hPLK1-KD, tal como se describió anteriormente, se expresaron en el citoplasma de levadura *S. cerevisiae*. Se transformaron como se describió anteriormente en la cepa de levadura YDE173 y se sembraron en placas de eliminación -Trp, -Ura, que contenían glucosa.

15 Se inocularon 5 mL de cultivos durante la noche en medio de eliminación (-Trp, -Ura, -Glc) a partir de vetas que contenían varias colonias y se cultivaron a 30°C. Los cultivos se diluyeron en YPAG a una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0,5. Se cultivaron a 30°C durante 7,5 horas. Para el extracto de células nativas, se recogieron 2,5 mL de cultivo celular normalizado a una OD600 de 3 por centrifugación, se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se resuspendieron en 75 µL de Y-PER (Pierce). El sedimento celular resuspendido se agitó brevemente en vórtice y se incubó agitando ligeramente a 20°C durante 20 minutos. Posteriormente, el material insoluble y agregado se sedimentó a velocidad máxima en una centrífuga Eppendorf a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con colorante de carga, se calentó a 100°C durante 5 min y se separó en una SDS-PAGE al 12%. La fusión soluble Gal4-AD-scFv y la parte de cadena pesada del Fab fusionado a Gal4-AD se visualizaron por transferencia Western mediante detección del residuo Gal4 con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Gal4-AD (Santa Cruz Biotechnology) como un conjugado primario y un conjugado anti-peroxidasa de ratón (Sigma) como anticuerpo secundario y usando un sustrato quimioluminiscente (Pierce) (Figura 11). Los procedimientos de SDS-PAGE y transferencia Western son bien conocidos por una persona experta en la técnica.

Listado de secuencias

<110> ESBATECH AG

30 <120> Marcos de inmunoglobulina que demuestran estabilidad mejorada en el ambiente intracelular y métodos para su identificación

<130> 08420PC

<150> US 60/382.649

<151> 2002-05-22

35 <150> US 60/438.246

<151> 2003-01-03

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

40 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

ES 2 656 427 T3

<400> 1

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 2

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

<400> 2

ES 2 656 427 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Glu
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

<400> 3

ES 2 656 427 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ala Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys His Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4

5 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

10 <400> 4

ES 2 656 427 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asp Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Gln Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Leu Thr His Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

ES 2 656 427 T3

Tyr Asp Thr Ser Lys Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Marco de anticuerpo

<400> 6

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Val Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Asn Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

10 <210> 7

<211> 109

ES 2 656 427 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

5 <400> 7

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Gly Gly Asn Asn Ile Glu Thr Ile Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Ser
35 40 45

Asp Asp Ser Val Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

<400> 8

ES 2 656 427 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala His Val Leu Arg Phe Leu Glu Trp Leu Pro Asp Ala Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

<400> 9

ES 2 656 427 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
 50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

<400> 10

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe
 20 25 30

Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

ES 2 656 427 T3

			35					40						45			
Arg	Ile	Asn	Pro	Asp	Ser	Gly	Asp	Thr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln		
	50					55					60						
Asp	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Gly	Thr	Val	Tyr	Met		
65					70					75					80		
Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				85					90					95			
Arg	Val	Pro	Arg	Gly	Thr	Tyr	Leu	Asp	Pro	Trp	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr		
			100					105					110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
	115						120										

<210> 11

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de anticuerpo

<400> 11

ES 2 656 427 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ala Gly Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 12

tgctctagaa gtgctgcagt gactgcag 28

10 <210> 13

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador de PCR

<400> 13

ggtgtcgcac ttacaggctg ctgggagcaa tcg 33

Referencias

- 5 Agatep, R., Kirkpatrick, D. L., Parchaliuk, R. A., Woods and Gietz, R. D. (1998). "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by lithium acetate/single-stranded carrier ADN/polyethylene glycol protocol." Technical Tips Online (<http://tto.trends.com>).
- Auf der Maur, A., Escher, D. and Barberis, A. (2001). "Antigen-independent selection of stable intracellular singlechain antibodies." *FEBS Lett* 508: 407-412.
- Benvenuto, E. and Tavladoraki, P. (1995). "Immunotherapy of plant viral diseases." *Trends Microbiol* 3 (7): 272-5.
- 10 Biocca, S. and Cattaneo, A. (1995). "Intracellular immunization: antibody targeting to subcellular compartments." *Trends Cell Biol* 5: 248-252.
- Biocca, S., Di Luzio, A., Werge, T. and Cattaneo, A. (1991). "Intracellular immunization: expression of antibody domains in the cytoplasm and in the nucleus of mammalian cells." *Cytotechnology* 5 Suppl 1: 49-50.
- 15 Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P. and Cattaneo, A. (1993). "Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of xenopus oocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 197 (2): 422-7.
- Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P. and Cattaneo, A. (1995). "Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endo-plasmic reticulum, cytosol and mitochondria." *Bio/Technology* 13(10): 1110-5.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. and Whitlow, M. (1988). "Single-chain antigen-binding proteins." *Science* 242(4877): 423-6.
- 20 Chothia, C. and Lesk, A. M. (1987). "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins." *J. Mol. Biol.* 196(4): 901-17.
- Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, W. R., Spinelli, S., Alzari, P. M. and Poljak, R. J. (1989). "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions." *J.Mol. Biol.* 342: 877-883.
- 25 Johnson, G., Kabat, E. A. and Wu, T. T. (1996). kabat database of sequences of proteins of immunological interest. WEIR'S Handbook of experimental Immunology I Immunochemistry and Molecular Immunology. Cambridge, MA, Blackwell Science Inv: 6.1-6.21.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. and Foeller, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242. Wasinghton, DC, US Department of health and human services.
- 30 Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A. and Virnekas, B. (2000). "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides." *J Mol Biol* 296(1): 57-86.
- 35 Cochet, O., Kenigsberg, M., Delumeau, I., Virone-Oddos, A., Multon, M. C., Fridman, W. H., Schweighoffer, F., Teillaud, J. L. and Tocque, B. (1998). "Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression." *Cancer Res* 58(6): 1170-6.
- Corpet, F. (1988). "Multalin. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." *Nucleic Acids Res* 16(22): 10881-10890.
- Cox, J. P., TomLinson, I. M. and Winter, G. (1994). "A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage." *Eur J Immunol* 24: 827-836.
- 40 de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderik, P., de Bruine, A. P., Arends, J.-W. and Hoogenboom, H. R. (1999). "a large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies." *J. Biol. Chem.* 274: 18218-18230.

- Escher, D., Bodmer-Glavas, M., Barberis, A. and Schaffner, W. (2000). "Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans." *Mol Cell Biol* 20(8): 2774-82.
- Escher, D. and Schaffner, W. (1996). "Improved "activator trap" method for the isolation of transcriptional activation domains from random ADN fragments." *Biotechniques* 21(5): 848-54.
- 5 Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H. R. and Plückthun, A. (1997).
 "Reliable cloning of functional variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system." *J Immunol Methods* 201: 35-55.
- Lener, M., Horn, I. R., Cardinale, A., Messina, S., Nielsen, U. B., Rybak, S. M., Hoogenboom, H. R., Cattaneo, A. and Biocca, S. (2000). "Diverting a protein from its cellular location by intracellular antibodies. The case of p21Ras." *Eur J Biochem* 267(4): 1196-205.
- 10 Marasco, W. A. (1997). "Intrabodies: turning the humoral immune system outside in for intracellular immunization." *Gene Ther* 4 (1): 11-5.
- Martineau, P., Jones, P. and Winter, G. (1998). "Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm." *J. Mol. Biol.* 280(1): 117-27.
- 15 Ohage, E. and Steipe, B. (1999). "Intrabody construction and expression. I. The critical role of VL domain stability." *J Mol Biol* 291(5): 1119-28.
- Ohage, E. C., Wirtz, P., Barnikow, J. and Steipe, B. (1999). "Intrabody construction and expression. II. A synthetic catalytic Fv fragment." *J Mol Biol* 291 (5): 1129-34.
- 20 Plückthun, A., Krebber, A., Krebber, C., Horn, U., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Nieba, L., Proba, K. and Riesenberg, D. (1996). *Producing antibodies in Escherichia coli: from PCR to fermentation. Antibody Engineering, a practical approach.* Oxford, Oxford University Press.
- Proba, K., Honegger, A. and Pluckthun, A. (1997). "A natural antibody missing a cysteine in VH: consequences for thermodynamic stability and folding." *J. Mol. Biol.* 265(2): 161-72.
- 25 Richardson, J. H. and Marasco, W. A. (1995). "Intracellular antibodies: development and therapeutic potential." *Trends Biotechnol* 13(8): 306-10.
- Rondon, I. J. and Marasco, W. A. (1997). "Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases." *Annu Rev Microbiol* 51: 257-83.
- Skerra, A. and Plückthun, A. (1988). "Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*." *Science* 240(4855): 1038-41.
- 30 Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. and Galeffi, P. (1993). "Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack." *Nature* 366(6454): 469-72.
- TomLinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. and Winter, G. (1992). "The repertoire of human germline VH sequences reveals about 50 groups of VH segments with different hypervariable loops." *J Mol Biol* 227: 776-798.
- 35 Tse, E., Lobato, M. N., Forster, A., Tanaka, T., Chung, G. and Rabbitts, T. (2002). "Intracellular antibody capture technology: application to selection of intracellular antibodies recognising the BCR-ABL oncogenic protein." *J. Mol Biol* 317((1)): 85-94.
- Verma, R., Boleti, E. and George, A. J. (1998). "Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems." *J Immunol Methods* 216(1-2): 165-81.
- 40 Visintin, M., Settanni, G., Maritan, A., Graziosi, S., Marks, J. D. and Cattaneo, A. (2002). "The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies." *J. Mol. Biol.* 317((1)): 73-83.
- Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T. H. and Cattaneo, A. (1999). "Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid *in vivo* system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 11723-8.

- Welschhof, M., Ternesss, P., Kolbinger, F., Zewe, M., Dübel, S., Dörsam, H., Hain, C., Finger, M., Jung, M., Moldenhauer, G., Hayashi, N., Little, M. and Opelz, G. (1995). "Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes." *J Immunol Methods* 179: 203-214.
- 5 Williams, S. C., Fripiat, J. P., TomLinson, I. M., Ignatovic, O., Lefranc, M. P. and Winter, G. (1996). "Sequence and evolution of the human germLine V-lambda repertoire." *J Mol Biol* 264: 220-232.
- Worn, A., Auf der Maur, A., Escher, D., Honegger, A., Barberis, A. and Plückthun, A. (2000). "Correlation between *in vitro* stability and *in vivo* performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors." *J. Biol. Chem.* 275(4): 2795-803.
- 10 Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M. and Schlom, J. (1992). "Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms." *Cancer Res* 52(12): 3402-8.
- Auf der Maur, A., Zahnd, C., Fischer, F., Spinelli, S., Honegger, A., Cambillau, C., Escher, D., Plückthun, A. and Barberis, A. (2002). "Direct *in vivo* screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework." *J Biol Chem* 277(47): 45075-45085.
- 15 Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988). "New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites" *Gene* 74: 527-534.
- Willuda, J., Honegger, A.; Waibel, P., Schubiger, A. Stahel, R., Zangmeister-Wittke, U. and Plückthun, A. (1999). "High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized antiepithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment" *Cancer Research* 59: 5758-5767.
- 20 Worn, A. and Plückthun, A. (1999). "Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering" *Biochemistry* 38: 8739-8750.

REIVINDICACIONES

1. Un marco de fragmento variable de cadena sencilla (fragmento scFv) que tiene la estructura general:
NH₂-VL-enlazador-VH-COOH; o
NH₂-VH-enlazador-VL-COOH
- 5 2. El marco de scFv de la reivindicación 1, que está fusionado a una segunda proteína.
3. El marco de scFv de la reivindicación 2, en el que dicha segunda proteína se selecciona del grupo que consiste en GFP, proteína fluorescente azul mejorada, proteína fluorescente amarilla mejorada, proteína fluorescente cian mejorada, un activador transcripcional y un dominio de unión a ADN.
- 10 4. El marco de scFv de la reivindicación 3, en el que dicho activador transcripcional es un dominio de activación de Gal4.
- 15 5. El marco de scFv de la reivindicación 3, en el que dicho dominio de unión a ADN es un dominio de unión a LexA o Gal4.
6. Una variante del marco de scFv de la reivindicación 1 que tiene 90% o más de identidad con la secuencia marco de scFv de la reivindicación 1 mientras se mantiene la estabilidad mejorada.
7. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende la secuencia marco del dominio VL y VH de la reivindicación 1 o una variante de la misma de acuerdo con la reivindicación 6.
- 20 8. Uso del marco de scFv de la reivindicación 1 o una variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 6 para injertar bucles hipervariables de anticuerpos existentes o para la creación de bibliotecas para aplicaciones en un entorno reductor.
9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 7 para uso en aplicación diagnóstica y terapéutica, validación de objetivos y terapia génica.
- 25 10. Un ácido nucleico que codifica el marco de scFv de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 7.
11. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
13. El ácido nucleico de la reivindicación 10 para uso en terapia génica.

Figura 1: Rendimiento intracelular después de la selección de Control de calidad en levadura *S. cerevisiae*

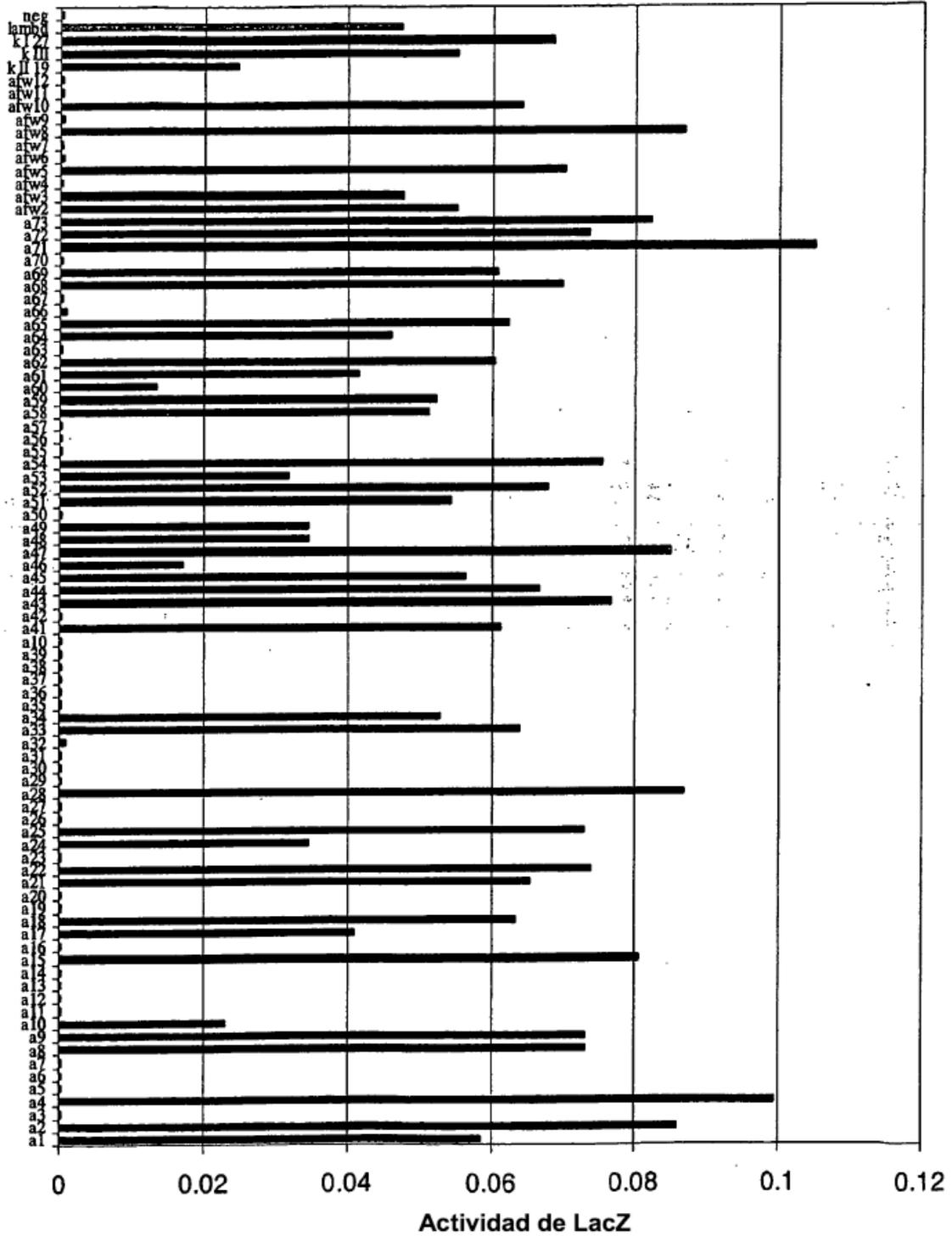
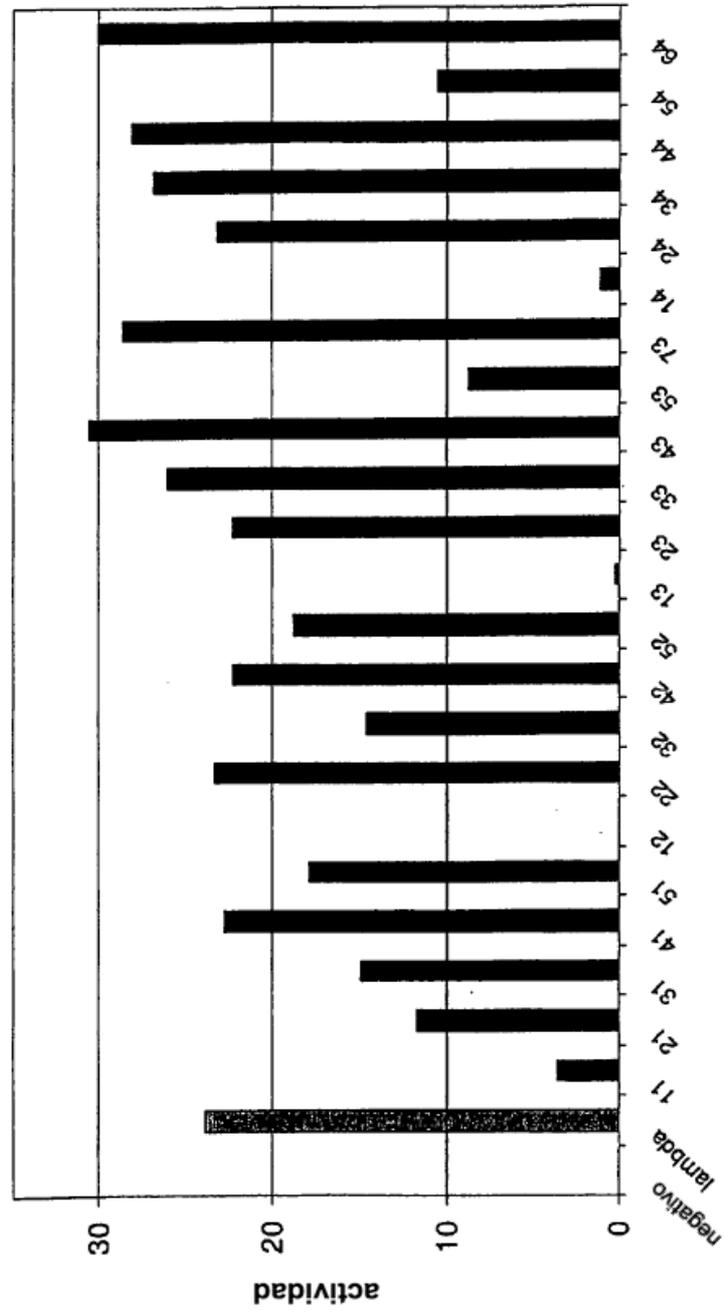


Fig 3:
Rendimiento intracelular de nuevos marcos en levadura *S. cerevisiae*



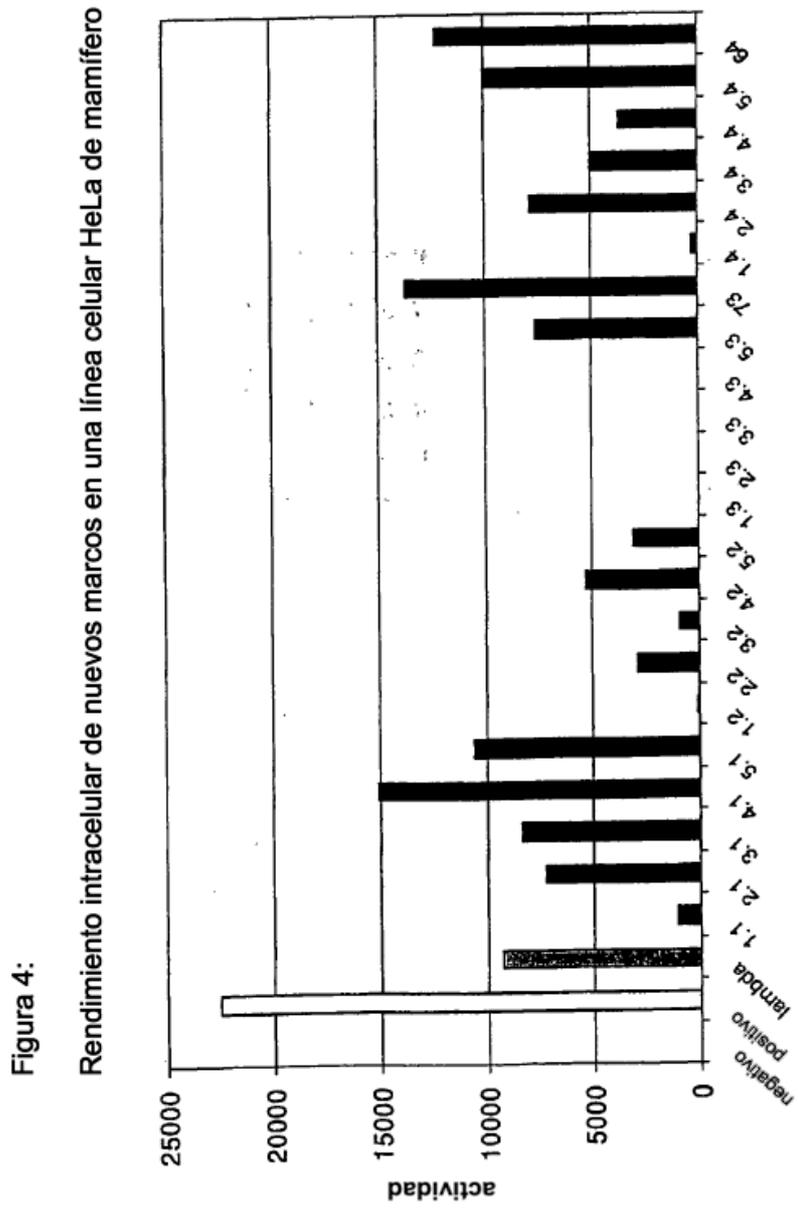


Figura 5: Expresión soluble en el citoplasma de levadura *S. cerevisiae*



Figura 6: Comportamiento de expresión en *E. coli*

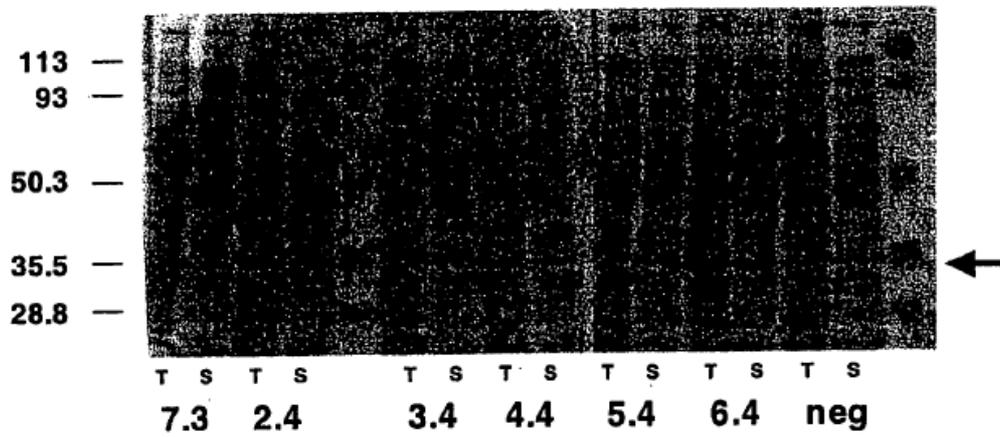
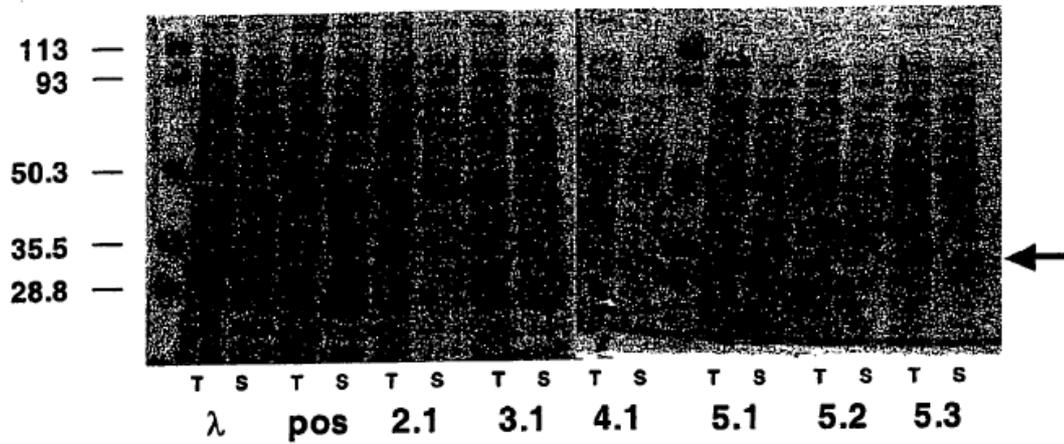


Figura 7:

Rendimiento intracelular de marcos novedosos seleccionados en diferentes líneas celulares de mamífero

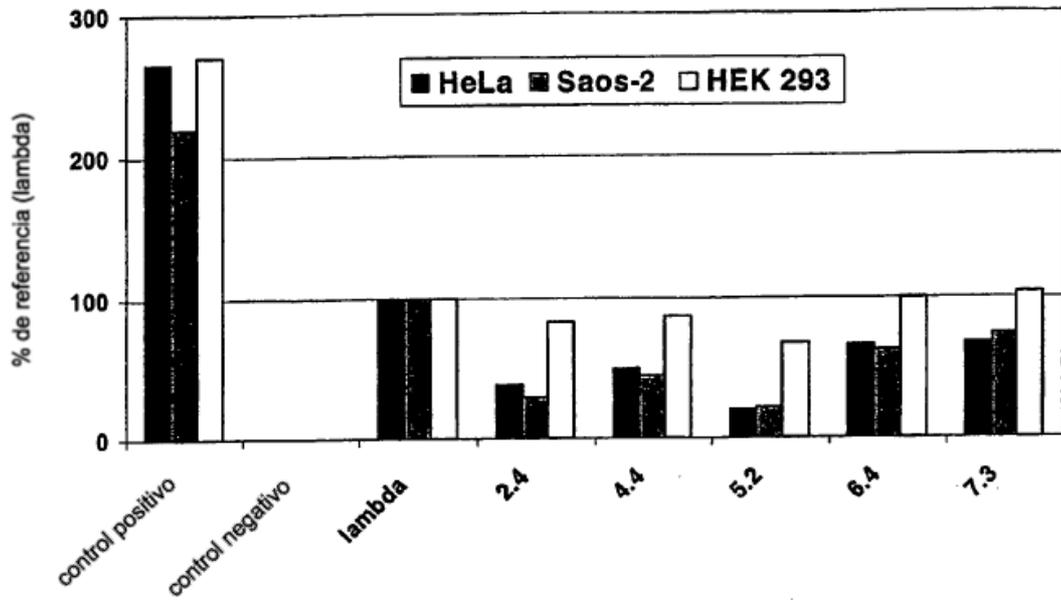


Fig. 8A: Resistencia a la agregación a 37°C

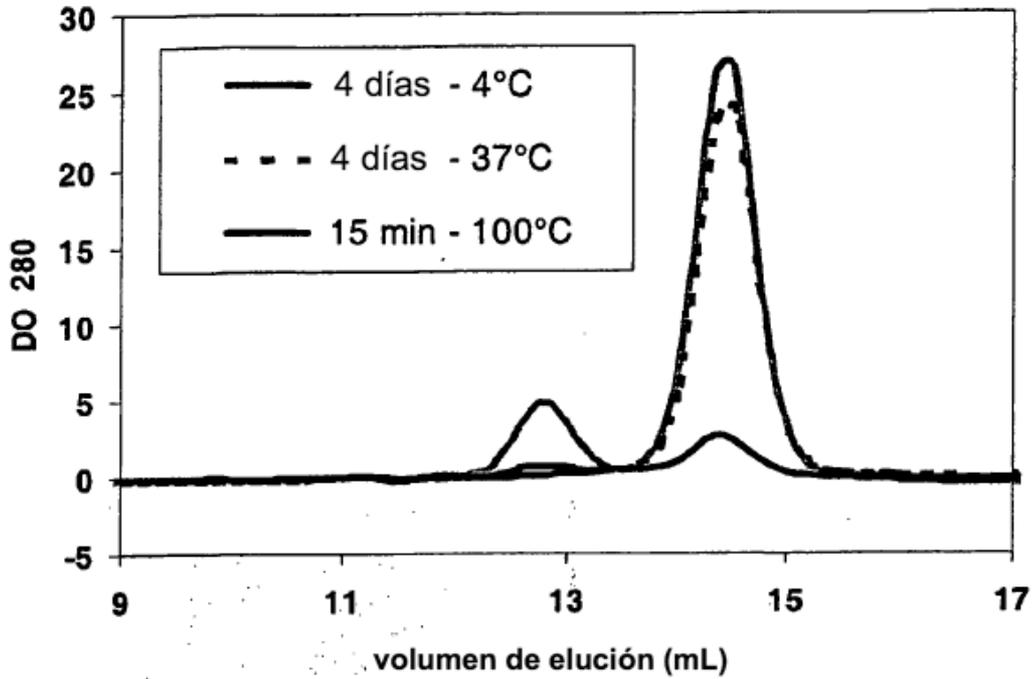


Fig 8B

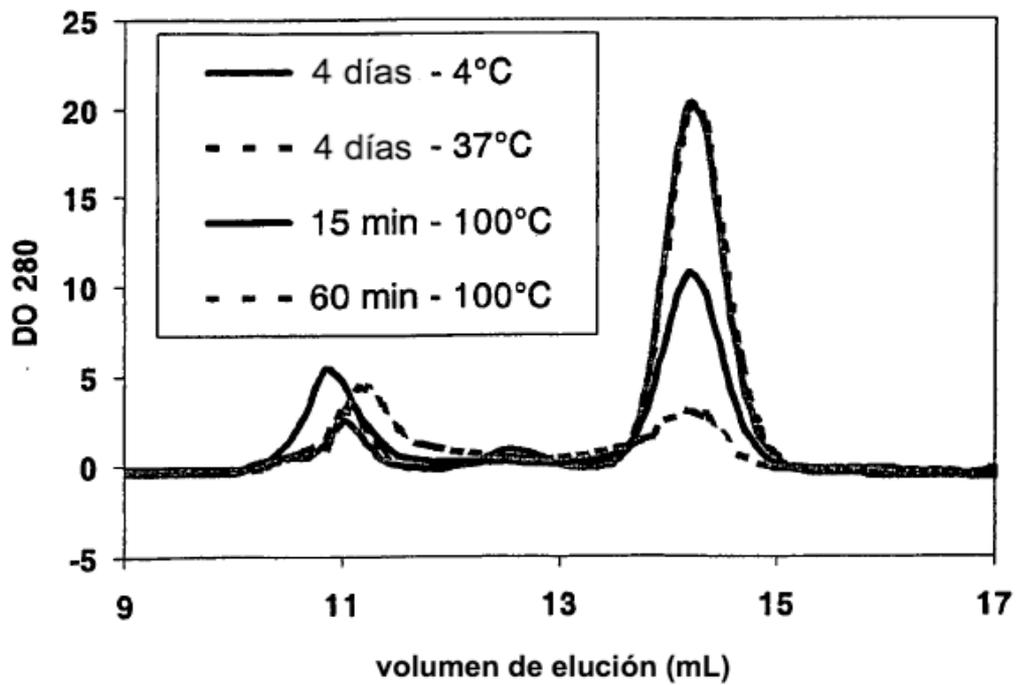


Figura 9: Resistencia a la agregación y degradación por proteasa en suero humano

Genotipo	1d	3d
2.4 κ1 - H3	no	3d
4.4 λ1 - H3	no	1d 3d
6.4 λ3 - H3	no	1d 3d
5.2 κ3 - H3	no	1d 3d
7.3 λ3 - H1b	no	1d 3d

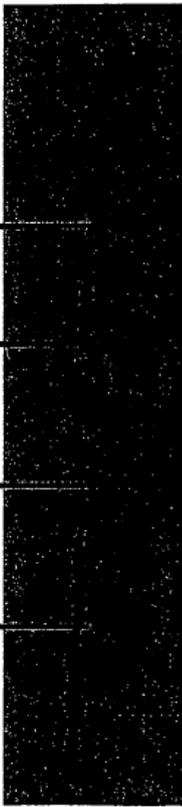


Figura 10

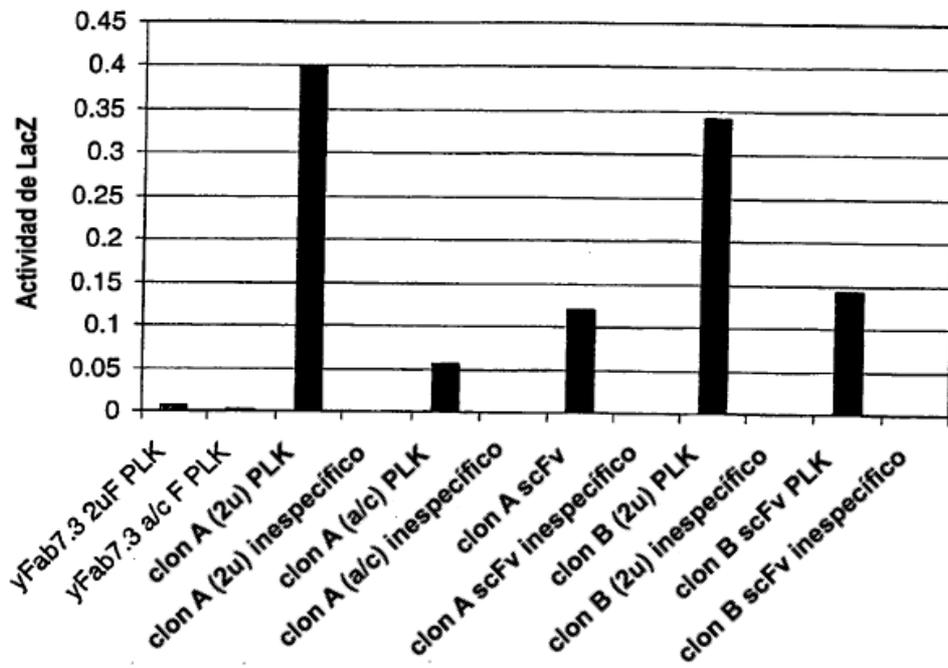


Figura 11

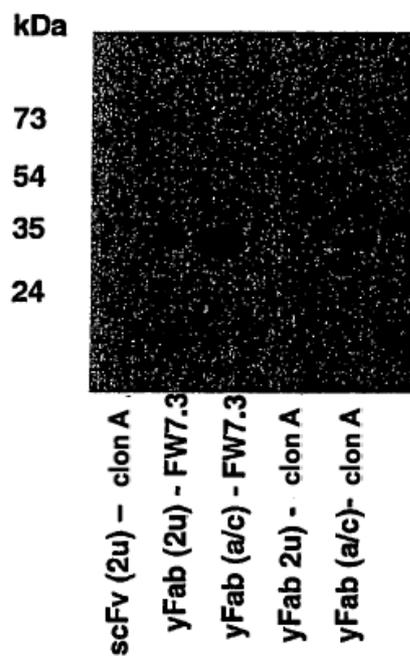


Tabla 1: Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
VH3																														
a02	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
* a44 *	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a25	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	N	.	F	D
a68	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	T	T	S	G	.	F	T
a28	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a01	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a41	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	K	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a09	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	S
a04	.	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	S
* a43 *	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a08	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a15	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a22	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a47	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
k IV 107	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a fw1	Q	M	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	V	S	G	.	F	A
a fw5	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
* a fw10 *	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	V	A	Q	P	G	G	S	L	R	V	S	C	A	A	S	G	.	F	S
a fw8	Q	V	Q	L	Q	E	S	.	G	G	D	L	V	K	P	G	Q	S	L	R	L	S	C	I	A	S	G	.	F	S
k III 25	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	F	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	N
k I 12	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	L	T
a61	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	H	C	A	A	S	G	.	F	T
k IV 103	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a18	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	T	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a69	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	V	A	S	G	.	F	I
a65 ¹	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	T	S	G	.	F	T
a59	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	K	T	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a58	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a51	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	V	S	G	.	F	T
k IV 98	Q	V	Q	L	Q	E	S	.	G	G	I	V	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	A	G	.	F	T
k III 10	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
k III 8	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a53	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
a49	.	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	T	A	S	G	.	F	T
a24	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	D	A	S	G	.	F	N
k II 114	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T
k III 23 ¹	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	P	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	I
a46	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	V	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
VH3																															
a10	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	I	
k II 129	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T	
k IV 135	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	K	S	L	R	L	S	C	E	A	S	G	.	F	T	
a60	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	V	A	S	G	.	F	T	
k I 32	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T	
k II 190	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T	
k I 22	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T	
k I 33	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	N	
k I 13	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	T	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T	
k I 61	Q	L	Q	L	Q	E	S	.	G	G	A	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T	
k III 18	E	V	Q	L	V	E	A	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	E	V	S	G	.	F	T	
k III 20	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	V	P	S	T	.	F	T	
k II 10	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	S	
k II 84A	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	T	
k I 19	Q	V	Q	L	Q	Q	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	N	
k I 17	Q	L	Q	L	Q	E	S	.	G	G	G	L	V	E	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	D	
k III 22	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	G	S	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	S	A	S	G	.	F	T	
k I 24	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	V	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	N	
k II 29	E	V	Q	L	V	E	T	.	G	G	G	V	V	Q	P	G	V	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	.	F	N	
k I 9	Q	V	Q	L	Q	E	S	.	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	V	S	C	A	A	S	G	.	F	T	
VH1a																															
a71	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	E	P	G	S	S	V	K	V	S	C	E	V	S	G	.	G	T	
a62	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	.	G	T	
k I 27	Q	M	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	M	Q	P	G	S	S	V	R	V	S	C	K	A	S	G	.	D	T	
a34	Q	M	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	L	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	.	G	T	
a45	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	.	G	T	
k II 9a	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	.	G	T	
k IV 78	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	L	K	I	S	C	K	A	S	G	.	G	T	
k I 47	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	M	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	.	G	T	
k I 64	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	A	E	V	K	K	S	G	S	S	V	K	V	S	C	K	T	S	G	.	G	S	
k II 124	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	.	G	P	
k III 11	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	V	S	G	.	G	T	
k I 34	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	A	E	L	K	E	P	G	E	S	L	K	I	S	C	T	L	S	G	.	V	T	

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
VH1b																														
a21	Q	M	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	R	V	S	C	Q	A	S	G	.	Y	T
* a33 *	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	T	A	S	G	.	Y	S
a54	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	V	S	G	.	Y	S
k II 86A	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	L	V	R	S	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	G	.	F	N
k I 65	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	T	E	V	K	R	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	.	Y	T
k II 42	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	V	Y	G	.	K	S
k I 37	E	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	L	M	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	T	G	.	Y	T
k II 205	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	L	V	R	S	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	G	.	F	N
k IV 25	E	V	R	L	V	Q	S	.	G	T	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	T	S	G	.	Y	S
k I 54	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	P	E	V	K	E	P	G	A	S	V	N	V	A	C	K	T	S	G	.	Y	I
k II 19	Q	V	Q	L	V	Q	S	.	G	A	E	V	K	M	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	V	S	G	.	S	S
k II 87	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	A	E	V	Q	K	P	G	A	S	V	N	I	S	C	K	A	S	G	.	S	T
k II 20	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	A	E	V	R	K	P	G	A	S	V	T	V	S	C	K	V	S	G	.	S	M
k II 136	Q	V	Q	L	Q	E	S	.	G	A	E	L	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	N	V	S	G	.	Y	S
VH4																														
a72	E	V	Q	L	V	E	S	.	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	G	V	S	G	.	D	A
a17	Q	V	Q	L	V	E	S	.	G	P	G	L	V	T	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	.	G	S
a48	Q	V	Q	L	Q	E	S	.	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	V	C	T	V	S	D	.	Y	P

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	
VH3																																
a02	F	S	N	Y	W	M	H	W	V	R	Q	G	P	G	K	G	L	V	R	V	A	R	I	N	T	D
* a44 *	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G	S
a25	F	S	T	Y	W	M	T	W	L	R	Q	F	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	N
a68	F	D	D	Y	C	L	S	W	V	R	Q	A	P	E	K	G	L	E	W	V	G	F	I	R	S	K
a28	F	N	D	Y	A	F	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	W	N
a01	F	S	N	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G	S
a41	F	S	R	Y	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	L	I	S	Y	D
a09	L	S	P	Y	D	L	H	W	I	R	Q	P	A	G	K	G	L	E	W	V	S	S	I	G	I	.
a04	F	S	N	T	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	K
* a43 *	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G	S
a08	F	N	N	A	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	G	R	I	K	S	N
a15	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	S	I	S	G	S
a22	L	N	N	A	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	K
a47	F	S	G	S	A	M	H	W	V	R	Q	A	S	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	T	T
k IV 107	F	S	S	Y	S	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	S	I	S	S	S
a fw1	F	N	D	Y	D	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	G	I	N	W	N
a fw5	F	S	D	Y	A	M	T	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	A	S
* a fw10 *	F	S	S	Y	A	M	Q	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	N	D
a fw8	F	G	D	Y	T	M	S	W	F	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	F	I	R	S	K
k III 25	F	R	S	H	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	P	E	W	V	A	N	I	N	P	E
k I 12	F	S	S	A	W	I	N	W	V	R	Q	T	P	A	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	D	.
a61	F	S	N	Y	G	M	H	W	V	R	Q	V	P	G	K	G	L	E	W	V	A	G	I	S	Y	D
k IV 103	F	D	D	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	W	N
a18	F	D	N	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	R	L	E	W	V	S	A	I	S	W	N
a69	F	D	D	Y	V	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	W	N
a65	F	S	T	H	A	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	C	V	S	T	I	S	G	T
a59	F	S	S	Y	S	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	S	P	.
a58	V	S	D	S	Y	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	L	Y	S	.
a51	F	S	N	T	W	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	G	N
k IV 98	F	S	N	Y	A	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	S	V	S	R	A
k III 10	F	S	K	A	W	M	N	W	V	R	Q	T	P	A	K	G	L	E	W	V	G	R	I	R	S	N
k III 8	F	S	N	A	W	M	N	W	V	R	Q	T	P	A	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	N
a53	F	S	F	F	A	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	A	D
a49	F	G	D	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	F	I	R	S	K
a24	F	N	L	Y	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	D	D
k II 114	V	S	S	N	Y	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	Y	S	.
k III 23	F	T	D	Y	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	N	I	K	Q	D
a46	F	D	D	Y	Y	M	T	W	I	R	R	A	P	G	K	G	L	E	W	I	S	Y	I	S	G	S

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AH _o	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	
VH3																																
a10	F	S	D	Y	Y	M	S	W	I	R	Q	T	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	T	S	S
k II 129	F	D	D	Y	A	M	Y	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	L	S	W	N
k IV 135	F	D	D	Y	S	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	L	S	W	N
a60	F	S	T	Y	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	E	G	L	E	W	V	A	I	I	S	S	D
k I 32	F	R	N	Y	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	I	I	H	Y	D
k II 190	L	N	N	Y	A	V	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	T	G	S
k I 22	F	S	D	H	Y	M	D	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	T	R	S
k I 33	F	S	N	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	D	W	V	S	G	I	S	G	S
k I 13	F	R	N	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	S	I	S	K	S
k I 61	F	S	S	Y	T	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	T	G	D
k III 18	F	S	T	Y	E	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	A	Y	I	N	T	G
k III 20	V	S	G	Y	E	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	S	Y	M	N	R	.
k II 10	F	D	D	Y	G	M	H	W	V	R	Q	T	P	G	Q	G	L	E	W	V	S	G	I	S	W	N
k II 84A	F	G	D	Y	G	M	H	W	V	R	Q	V	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	W	N
k I 19	F	D	D	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	W	N
k I 17	F	D	N	Q	V	M	H	W	V	R	Q	V	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	N	W	N
k III 22	F	T	D	Y	W	M	A	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	D	W	V	A	N	I	N	Q	E
k I 24	F	R	S	T	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	P	E	W	V	A	G	I	S	F	D
k II 29	F	R	S	T	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	P	E	W	V	A	G	I	S	F	D
k I 9	V	N	N	Y	Y	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	F	S	S	S	D
VH1a																																
a71	F	S	S	Y	P	I	A	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	L	G	R	I	I	P	M
a62	F	G	K	H	A	I	S	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	.	.	I
k I 27	F	S	S	Y	T	F	N	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	I	P	.
a34	F	S	S	H	A	I	S	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	.	.	I
a45	F	R	S	Y	A	I	N	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	.	.	I
k II 9a	F	S	S	Y	A	I	N	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	I	P	.
k IV 78	F	N	T	D	H	F	N	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	I	P	F
k I 47	F	S	T	S	P	L	T	W	M	R	Q	A	P	G	Q	G	F	E	W	M	G	G	I	I	P	.
k I 64	L	S	S	F	S	I	S	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	G	I	I	P	.
k II 124	F	R	S	S	P	M	S	W	L	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	I	S	.
k III 11	F	S	S	Y	T	I	N	W	V	R	Q	A	P	G	Q	R	P	E	L	M	G	G	I	I	P	.
k I 34	F	S	N	S	W	I	D	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	V	G	L	I	Y	A	.

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	
VH1b																																
a21	F	T	G	H	Y	M	H	W	V	R	Q	V	P	G	Q	G	L	Q	W	M	G	W	L	N	P	D
* a33 *	F	T	G	Y	F	L	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	R	I	N	P	D
a54	L	T	E	L	S	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	E	G	L	E	W	M	G	G	F	.	.	D
k II 86A	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	K	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	.
k I 65	F	T	S	H	D	I	T	W	V	R	Q	P	T	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	L	S	P	.
k II 42	L	A	E	L	S	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	P	E	W	M	G	G	F	D	A	.
k I 37	F	S	S	Y	W	I	E	W	V	K	Q	R	P	G	H	G	L	E	W	I	G	E	I	L	P	.
k II 205	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	K	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	.
k IV 25	F	T	T	Y	G	I	S	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	.	.	S
k I 54	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	P	E	W	M	G	W	I	N	P	.
k II 19	L	K	E	L	S	V	H	W	V	R	Q	T	P	G	K	G	L	E	W	M	G	G	F	D	P	.
k II 87	F	S	S	S	Y	I	H	W	L	R	Q	A	R	G	Q	G	L	E	W	M	G	M	I	D	P	.
k II 20	L	T	D	L	S	V	H	W	L	R	Q	T	P	G	K	G	L	E	W	M	G	G	F	A	L	.
k II 136	L	T	D	L	S	M	H	W	V	R	Q	V	P	G	K	G	L	E	W	M	G	G	Y	D	P	.
VH4																																
a72	I	S	S	G	G	.	.	.	Y	Y	W	N	W	I	R	Q	H	P	V	K	G	L	E	W	I	G	C	I	.	.	.	
a17	M	T	S	G	S	.	.	.	S	Y	W	G	W	V	R	Q	P	P	A	K	G	L	E	W	I	G	T	I	.	.	.	
a48	I	S	S	G	Y	F	W	G	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	Q	W	V	A	S	I	F	H	T	

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	
VH3																																
a10	.	.	.	G	R	C	T	K	Y	A	D	A	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	V	Y	L	Q	
k II 129	.	.	.	S	D	T	V	A	Y	G	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	G	K	K	S	L	Y	L	Q	
k IV 135	.	.	.	S	D	K	I	G	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	A	L	Y	L	Q	
a60	.	.	.	G	S	D	K	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	N	K	R	L	Y	L	Q		
k I 32	.	.	.	G	T	N	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	D	T	L	Y	L	H		
k II 190	.	.	.	G	G	G	I	Y	Y	E	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	I	S	K	N	T	L	Y	L	Q	
k I 22	.	.	.	G	S	S	I	Y	Y	A	D	S	V	Q	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	E	N	S	V	Y	L	Q	
k I 33	.	.	.	G	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	S	R	F	T	M	S	R	D	N	S	K	N	T	L	S	L	Q	
k I 13	.	.	.	G	S	F	I	Y	Y	T	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	F	L	Q	
k I 61	.	.	.	G	G	S	T	H	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	
k III 18	.	.	.	G	S	I	K	H	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	A	K	R	S	V	Y	L	Q	
k III 20	.	.	.	D	G	V	T	L	Y	S	D	S	V	R	G	R	F	T	L	S	R	D	N	A	N	N	S	L	Y	L	Q	
k II 10	.	.	.	N	D	N	I	G	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	
k II 84A	.	.	.	S	G	N	I	A	Y	V	D	S	V	K	G	R	F	T	V	S	R	D	N	A	E	N	S	L	Y	L	Q	
k I 19	.	.	.	S	G	N	I	G	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	S	A	K	N	S	L	Y	L	Q	
k I 17	.	.	.	N	N	D	I	G	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	H	
k III 22	.	.	.	G	S	E	T	N	S	L	D	S	V	D	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	R	N	S	V	F	L	Q	
k I 24	.	.	.	G	T	N	E	Y	F	A	D	S	M	R	G	R	S	T	I	S	R	D	N	F	K	N	T	L	S	L	E	
k II 29	.	.	.	G	T	N	E	Y	F	A	D	S	M	R	G	R	S	T	I	S	R	D	N	F	K	N	T	L	S	L	E	
k I 9	.	.	.	G	T	Y	Q	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	T	T	V	D	L	Q	
VH1a																																
a71	.	.	.	F	G	T	T	D	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	T	T	N	T	A	Y	M	E	
a62	P	M	.	F	G	T	A	N	Y	A	P	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	S	T	A	S	M	D	
k I 27	.	.	.	I	L	G	T	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	D	R	V	T	I	T	A	D	I	S	R	S	T	A	Y	M	E
a34	P	I	.	L	D	I	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	K	S	T	S	T	A	H	M	E	
a45	P	M	.	F	G	T	P	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	N	T	A	Y	M	E	
k II 9a	.	.	.	M	Y	D	T	E	D	Y	A	Q	K	F	R	D	R	V	T	I	I	A	D	E	S	T	T	T	T	Y	M	E
k IV 78	.	.	.	I	G	T	P	N	H	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	F	T	S	T	A	Y	M	E	
k I 47	.	.	.	I	F	G	T	P	N	N	A	Q	T	F	Q	D	R	L	T	I	S	A	D	Q	A	T	H	T	A	Y	M	E
k I 64	.	.	.	V	L	G	T	S	S	L	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	S	A	D	D	S	T	S	T	A	Y	M	D
k II 124	.	.	.	M	F	G	T	P	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	F	T	I	T	A	D	E	S	T	S	T	V	D	M	E
k III 11	.	.	.	I	F	G	T	I	N	H	V	E	R	F	R	D	R	V	T	F	T	A	D	T	S	T	S	I	A	Y	M	E
k I 34	.	.	.	G	D	S	D	A	K	Y	S	P	S	F	Q	G	H	V	T	I	S	V	D	K	S	L	T	T	A	F	L	Q

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
VH1b																															
a21	.	.	.	S	G	A	T	N	S	A	E	S	F	K	G	R	V	S	L	T	R	D	T	S	L	N	T	A	Y	M	E
* a33 *	.	.	.	S	G	D	T	I	Y	A	Q	K	F	Q	D	R	V	T	L	T	R	D	T	S	I	G	T	V	Y	M	E
a54	P	E	.	D	G	E	P	V	Y	A	E	K	F	E	G	R	L	T	M	I	E	D	T	S	T	D	T	A	Y	M	E
k II 86A	.	.	E	N	G	D	T	E	Y	A	P	K	F	K	G	K	A	T	M	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	Q
k I 65	.	.	N	T	G	D	T	G	F	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	R	N	T	S	T	S	T	A	S	L	E
k II 42	.	.	E	D	G	E	T	I	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	I	T	M	T	E	D	T	S	T	D	T	A	Y	M	E
k I 37	.	.	G	S	G	S	T	N	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	F	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	M	Q
k II 205	.	.	E	N	G	D	T	E	Y	A	P	K	F	K	G	K	A	T	M	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	Q
k IV 25	G	R	.	N	G	N	T	N	Y	A	Q	R	L	Q	G	R	I	T	M	T	T	D	T	S	T	S	T	A	Y	M	E
k I 54	.	.	R	T	G	S	T	N	S	A	Q	T	F	Q	G	R	V	T	M	T	M	D	T	S	I	N	T	A	Y	M	E
k II 19	.	.	E	D	G	D	T	I	H	P	H	Q	F	Q	G	R	V	T	T	T	E	D	S	S	I	D	T	A	Y	M	E
k II 87	.	.	S	G	E	R	A	D	Y	A	Q	M	L	E	G	R	L	T	V	T	R	D	A	S	T	S	T	I	Y	L	D
k II 20	.	.	E	E	G	E	K	I	S	A	Q	R	F	Q	G	R	V	T	M	T	E	D	T	S	T	D	T	A	Y	L	H
k II 136	.	.	E	D	G	E	T	V	Y	A	R	E	F	Q	G	R	V	T	M	T	E	D	T	S	T	D	T	A	Y	M	E
VH4																															
a72	Y	K	.	S	G	S	T	I	Y	N	P	S	L	T	S	R	L	T	I	S	V	D	T	S	K	T	Q	V	S	L	N
a17	Y	Y	.	S	G	N	T	Y	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	P	S	K	N	Q	F	S	L	K
a48	.	.	.	G	S	N	Y	Y	N	P	S	L	R	S	R	L	S	I	S	V	D	R	T	K	N	Q	F	S	L	R	

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123
VH3																															
a02	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	T	G	G
* a44 *	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	A	H	V	L	R	F	L	E	W
a25	M	N	S	L	R	P	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	D	L	E
a68	M	N	S	L	E	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	T	R	D	V	E	R	F	D
a28	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	L	Y	Y	C	V	K	G	G	Y	C	S	G	G	G
a01	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	L	Y	Y	C	A	K	R	P	R	T	N	V	F	G	P
a41	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	M	N	Y	D
a09	M	N	T	L	R	A	K	D	T	G	L	Y	Y	C	A	R	D	T	G	P	G	M	A
a04	M	N	S	L	K	T	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	E	R	G	S	S	S	W	F	D	Q
* a43 *	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	A	G	I	A	V
a08	M	N	S	L	K	T	E	D	T	A	I	Y	Y	C	T	T	G	D	T	R	R	L	E	N	Y	F
a15	M	D	S	L	R	A	G	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	R	T	F	L	P	H	D	R	S	G
a22	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	H	Y	D	S	S	G	Y	Y
a47	M	T	S	L	K	I	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	C	R	P	G	P
k IV 107	N
a fw1	M	N	S	L	R	P	E	D	T	A	Q	Y	Y	C	A	R	D	R	D	M	W	F
a fw5	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	R	G	V	D	L	P	Y	Y	Y	G	S	G	.	.
* a fw10 *	M	N	S	L	R	S	D	D	T	A	L	Y	Y	C	A	R	E	I	G
a fw8	M	D	N	L	K	T	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	E	G	H	L	A	H	L	E	W
k III 25	M	S	S	L	R	G	E	D	T	A	L	Y	H	C	V	I	N	P
k I 12	M	N	S	L	K	T	E	D	T	G	V	Y	Y	C	V	T	G	I	P	R	S
a61	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	Q	A	Y	C	G	G	D	C	H	S
k IV 103	M	N	S	L	R	V	E	D	T	A	F	Y	Y	C	V	K	D	S	G	G
a18	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	L	Y	Y	C	A	K	S	L	S	G	S
a69	M	N	F	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	Y	H	G	S	G
a65	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	G	V	G	Q	L
a59	M	S	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	D	A	Y	T	I
a58	I	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	M	N	D	F	W
a51	M	N	S	L	K	T	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	T	Q	R	W
k IV 98
k III 10	M	N	S	L	K	T	E	D	T	G	V	Y	Y	C	V	T	G	I	P	R	S
k III 8	V	N	R	L	K	T	E	D	T	G	V	Y	Y	C	V	T	G	I	P	R	S
a53	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	E	G
a49	M	N	S	L	K	T	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	L	G	G	S	G	L
a24	M	N	S	L	R	A	G	D	T	A	R	Y	Y	C	V	R	E	R	L
k II 114	L	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	S	G	G
k III 23	M	D	A	L	R	A	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	N	T	P	L
a46	M	N	S	L	R	G	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	N	Y	C	S	G	G	T	C

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123
VH1b																															
a21	L	T	R	L	S	N	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	X	G	S	A	D	S	L	Y	D	A
* a33 *	L	T	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	V	P	R	G	T	Y	L	D	P	W	D	Y	.	.	.
a54	L	S	G	L	R	S	E	D	T	A	I	Y	Y	C	A	A	A	Y	F	G	S	G	S	Y	Y	P	N	W	.	.	.
k II 86A	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	N	A	L	T	T	A	Y	A
k I 65	L	S	D	L	N	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	A	N	P	N	C	N	S	V	S	C	S	K	G	D
k II 42	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	E	V	F	Y	G	S	G	T	V	R	D	Y	G	.	.
k I 37	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	Y	Y	R	Y	D
k II 205	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	N	A	L	T	T	A	Y	A
k IV 25	L	R	S	L	R	P	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	E	H	D	S	S	G	Y	A
k I 54	L	S	R	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	W	S	G	Y	D	P	T	Y	Y
k II 19	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	T	N	L	N	E	N	Y	A	E	N	S	R
k II 87	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	R	Y	Y	C	A	R	G	Q	E	G	V	V	G	T	A	N	H	V	P	Y	.
k II 20	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	S	G	D	D	G	Y	D	I	E	A
k II 136	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	S	G	M	L	Q	M	G	G	A
VH4																															
a72	L	R	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	S	D	A	Y	G	
a17	L	T	S	L	T	A	T	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	E	A	D	D	Y	D	E	H	G	D	F	S	Y	.	
a48	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	L	Y	Y	C	A	N	S	G	V	P	T	Y	K	Y	Y

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AHo	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
VH3																										
a02	S	S	R	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
* a44 *	L	P	D	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a25	S	F	G	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
a68	T	S	G	Y	Y	E	A	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a28	C	S	D	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
a01	G	L	N	Y	F	D	L	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a41	V	S	G	N	C	D	C	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a09	V	V	G	I	P	L	D	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a04	N	P	Y	C	F	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
* a43 *	A	G	T	C	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a08	G	W	G	P	S	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a15	Y	Y	A	Y	.	.	.	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a22	K	H	D	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
a47	G	N	K	F	I	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k IV 107
a fw1	W	G	N	G	L	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a fw5	S	Y	N	V	P	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
* a fw10 *	A	T	G	Y	L	D	N	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a fw8	F	P	G	D	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k III 25	S	V	G	V	P	D	L	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k I 12	Y	G	S	Y	Y	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a61	G	A	E	Y	F	P	H	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k IV 103	G	V	G	L	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a18	Y	Y	S	P	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a69	R	T	H	T	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
a65	W	L	S	G	F	D	H	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a59	S	W	Y	E	F	D	W	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a58	S	G	H	P	G	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a51	F	Q	S	G	E	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k IV 98
k III 10	Y	G	S	Y	Y	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k III 8	Y	G	S	Y	Y	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a53	S	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
a49	S	I	N	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a24	N	D	D	A	F	D	T	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
k II 114	D	R	A	D	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k III 23	R	S	D	P	F	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
a46	Y	P	H	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AH _o	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149		
VH3																												
a10	S	Y	S	H	L	S	H	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k II 129	G	K	G	G	F	D	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
k IV 135	H	W	G	A	L	D	M	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
a60	G	H	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k I 32	G	G	I	L	G	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k II 190	G	R	C	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k I 22	F	S	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
k I 33	C	F	G	S	L	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k I 13	D	P	S	Y	F	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k I 61	D	R	R	P	F	D	H	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k III 18	L	A	D	A	F	D	F	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S	
k III 20	P	E	D	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S	
k II 10	S	P	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k II 84A	N	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
k I 19	V	F	D	G	L	D	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
k I 17	R	Y	Y	G	M	D	V	W	G	R	G	T	T	V	T	V	S	S	
k III 22	T	A	W	Y	F	D	V	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	
k I 24	G	L	G	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
k II 29	G	L	G	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	I	S	S	
k I 9	D	P	P	R	L	D	N	W	G	R	G	T	T	V	T	V	S	S	
VH1a																												
a71	F	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a62	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
k I 27	F	D	L	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S	S
a34	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a45	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
k II 9a	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
k IV 78	M	D	V	W	G	P	G	T	T	V	T	V	S	S
k I 47	F	D	L	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k I 64	R	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k II 124	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k III 11	I	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k I 34	D	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

Tabla 1 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VH

AH _o	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149		
VH1b																												
a21	F	D	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
* a33 *	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
a54	F	D	P	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k II 86A	M	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k I 65	Y	T	G	I	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
k II 42	M	D	V	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
k I 37	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k II 205	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k IV 25	L	E	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k I 54	F	D	S	W	G	T	G	T	L	V	T	V	S	S
k II 19	F	D	Q	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k II 87	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k II 20	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
k II 136	S	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
VH4																												
a72	L	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
a17	F	D	I	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S
a48	F	E	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

Tabla 2: Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AHo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Vk1																															
a72	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	D	I
a02	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	F	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	A	C	R	A	S	Q	.	.	G	I
a44	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	I
a25	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	K	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	L
a68	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	I
a28	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	D	I
a09	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	H	.	.	D	I
a62	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	I
a54	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	T	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	D	I
k IV 40	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	A	C	R	A	S	Q	.	.	S	I
a fw5	P	S	C	L	H	L	.	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	H	V	.	.	R	A
a fw8	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	V	T	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	D	I
a fw 10	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	I
k I 27	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	I	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	I
k III 25	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	L	T	C	R	A	S	Q	.	.	G	I
a17	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	.	.	S	I
a61	D	I	Q	I	T	Q	S	P	S	S	V	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	G	I
a18	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	D	I
a34	G	D	R	V	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	T	I
a45	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	T	V	T	I	T	C	R	A	S	E	.	.	T	I
a64	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	T	I
k IV 98	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	V
k II 86A	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	V	I
a53	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	I	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	V	I
k II 42	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	G	Q	.	.	S	I
k II 114	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	I	G	D	R	V	T	I	S	C	R	A	S	Q	.	.	N	I
k II 205	I	E	I	V	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	D	I
k I 65	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	N	I
k I 37	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	G	I
k III 23	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	I	L	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	L
k IV 25	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	F	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	N	I
k I 54	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	R	.	.	N	I
k II 19	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	D	I
k I 32	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	S	C	R	A	S	Q	.	.	G	I
k I 34	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	N	I
k I 19	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	Q	.	.	D	I
k I 50	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	F	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	G	I
k III 22	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	F	S	A	S	T	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	G	I
k I 64	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	G	I

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AHo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Vκ1																															
k II 29	D	I	Q	L	T	Q	S	P	P	S	L	S	A	S	V	G	D	K	V	T	I	T	C	R	A	S	E	.	.	S	I
k I 13	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	T	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	G	Q	.	.	S	I
k I 9	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	R	.	.	S	I
k I 24	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	F	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	N	I
k II 124	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	V	S	Q	.	.	N	I
k II 10	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	S	I
Vκ3																															
a41	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	X	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	S	V
a01	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	I	L	Y	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	S	V
k IV 103	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	S	A	A	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	G	V
k IV 135	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	T	L
k II 190	E	T	T	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	S	V
k II 136	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	S	V
Vκ2																															
k II 129	E	I	V	L	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	L	Y
Vλ1																															
a15	Q	A	V	L	T	Q	P	.	S	S	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
a22	Q	S	V	L	T	Q	P	.	P	S	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	R	.	.	S	N
a71	Q	A	V	V	T	Q	E	.	P	S	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
k IV 107	Q	S	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	S	T	.	.	S	N
k I 12	Q	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
a65	L	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	A	S	G	T	F	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	G	S	.	.	S	N
a58	Q	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	A	S	G	S	P	G	Q	S	V	T	I	S	C	T	G	T	S	.	.	S	D
k III 8	L	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
k III 10	S	Y	E	L	T	Q	P	.	P	S	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	P	I	S	C	S	G	S	G	.	.	S	N
a10	L	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	A	S	G	T	L	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
k II 9a	E	I	V	M	T	Q	S	.	P	S	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
k IV 78	Q	S	V	V	T	Q	P	.	P	S	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
k I 22	Q	S	A	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	G	A	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	T	G	S	S	.	.	S	N
k II 20	Q	S	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
k III 20	Q	S	V	V	T	Q	P	.	P	S	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	A	S	.	.	S	N
k I 17	S	Y	V	L	T	Q	P	.	P	S	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	D	.	.	S	N

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AHo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Vλ2																															
a47	Q	S	A	L	T	Q	P	.	A	S	V	S	G	S	P	G	Q	S	I	T	I	S	C	T	G	T	S	.	.	S	D
a59	Q	S	A	L	T	Q	P	.	A	S	V	S	G	S	P	G	Q	W	I	T	I	S	C	S	G	T	G	.	.	S	D
a51	Q	S	A	L	T	Q	P	.	R	S	V	S	G	S	P	G	Q	S	V	T	I	S	C	T	G	T	S	.	.	S	D
a24	Q	S	A	L	T	Q	P	.	A	S	V	S	G	S	P	G	Q	S	I	T	I	S	C	T	G	T	S	.	.	S	D
k II 87	Q	S	A	L	T	Q	P	.	R	S	V	S	G	S	P	G	Q	S	V	T	I	S	C	T	G	T	S	.	.	S	D
k I 2	Q	A	V	V	T	Q	E	.	P	S	L	T	V	S	S	G	G	T	V	T	L	T	C	S	S	S	T	.	.	G	P
Vλ3																															
a04	Q	S	V	L	T	Q	P	.	P	S	L	S	V	A	P	G	E	T	A	R	I	N	C	G	G	N	N
a33	L	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	G	G	N	N
a43	S	Y	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	T	V	T	C	G	G	N	N
a08	Q	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	V	S	I	T	C	S	G	D	G
a21	D	I	Q	M	T	Q	S	.	P	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	A	S	I	T	C	S	G	D	K
a fw1	S	S	E	L	T	Q	D	.	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	H	G	D	S
a69	Q	S	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	A	T	I	T	C	S	G	D	K
a49	Q	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	T	C	G	G	S	N
a48	Q	P	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	A	R	I	T	C	S	G	D	E
a46	Q	S	V	L	T	Q	P	.	P	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	A	S	I	T	C	S	G	D	L
a60	Q	T	V	V	T	Q	E	.	P	S	F	S	V	S	P	G	G	T	V	T	L	T	C	G	L	S	S

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AH _o	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63			
Vκ1																																			
k II 29	N	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	R	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	
k I 13	G	I	F	L	N	W	Y	Q	Q	R	P	G	K	A	P	K	V	L	I	Y	A	
k I 9	D	N	H	L	N	W	Y	R	Q	R	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	A	
k I 24	I	K	F	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	
k II 124	F	D	W	V	A	W	H	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	
k II 10	S	G	F	L	N	W	Y	Q	Q	R	P	G	R	A	P	K	V	L	I	Y	A	
Vκ3																																			
a41	T	S	S	S	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	
a01	S	N	Y	F	A	W	Y	Q	Q	R	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	
k IV 103	S	T	N	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	
k IV 135	T	H	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	
k II 190	S	G	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G
k II 136	S	N	Y	L	S	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	D	
Vκ2																																			
k II 129	I	D	G	N	T	Y	L	N	W	F	H	Q	R	P	G	Q	S	P	R	R	L	I	Y	K	
Vλ1																																			
a15	I	G	S	N	Y	V	Y	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	S
a22	L	G	S	N	T	V	T	W	Y	Q	H	V	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	T
a71	I	G	N	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D
k IV 107	I	G	D	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	Q	L	L	I	Y	D
k I 12	I	G	S	N	Y	V	Y	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	R
a65	I	G	T	N	P	V	N	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	S	L	L	I	Y	T
a58	I	G	H	Y	N	Y	V	C	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	V	L	I	Y	D
k III 8	I	G	T	N	Y	V	Y	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	N
k III 10	I	E	S	H	T	V	N	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	N
a10	I	G	R	N	T	V	N	W	Y	Q	Q	L	S	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	R
k II 9a	I	G	S	N	T	V	N	W	Y	Q	Q	F	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	T
k IV 78	I	G	S	H	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	T	L	V	I	Y	D
k I 22	I	G	G	G	Y	D	V	H	W	Y	Q	H	L	P	G	T	A	P	N	L	L	I	Y	G
k II 20	I	G	N	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D
k III 20	I	G	N	N	Y	V	Y	W	Y	R	Q	L	P	G	M	A	P	K	L	L	I	Y	S
k I 17	I	G	S	H	T	V	S	W	Y	Q	H	F	P	G	T	A	P	P	L	L	I	Y	T

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AH _o	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Vλ2																																
a47	V	G	G	.	.	.	Y	D	Y	V	S	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	M	I	Y	E
a59	I	G	A	.	.	.	Y	N	Y	V	S	W	Y	Q	H	Y	P	G	K	A	P	K	L	M	I	Y	D
a51	V	S	F	.	.	.	S	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	V	I	Y	A
a24	V	G	G	.	.	.	Y	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	M	I	Y	D
k II 87	V	G	G	.	.	.	Y	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	V	I	Y	D
k I 2	V	T	S	.	.	.	A	F	Y	A	N	W	F	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	A	L	I	Y	S
Vλ3																																
a04	I	G	D	K	S	V	H	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	M	Y	Y
a33	I	E	T	I	S	V	H	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	V	S	D
a43	I	G	S	K	S	V	H	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	V	Y	D
a08	L	G	H	K	Y	V	S	W	Y	Q	Q	R	P	G	Q	S	P	I	L	V	I	C	Q
a21	L	G	D	K	Y	A	C	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	V	L	V	I	Y	Q
a fw1	L	R	Y	Y	S	A	S	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	L	L	V	M	Y	G
a69	L	G	D	Q	Y	A	C	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	V	L	L	I	Y	E
a49	I	G	S	R	N	V	H	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	V	Y	D
a48	L	P	K	Q	Y	A	Y	W	Y	Q	Q	R	P	G	Q	A	P	V	L	I	I	Y	E
a46	L	G	D	T	Y	A	Y	W	Y	Q	Q	R	P	G	Q	S	P	G	L	V	I	Y	E
a60	G	S	V	S	T	.	S	Y	Y	P	S	W	Y	Q	Q	T	P	G	Q	A	P	R	T	L	V	H	S

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AHo	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	
Vκ1																																	
a72	.	.	.	A	S	N	L	E	I	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	F	T	I	S	N	
a02	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S	
a44	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
a25	.	.	.	T	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
a68	.	.	.	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	T	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
a28	.	.	.	A	T	E	L	E	P	G	A	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	S	F	T	I	T	N	
a09	.	.	.	A	S	D	L	Q	K	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	H	F	T	F	T	I	S	S	
a62	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	Y	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
a54	.	.	.	A	T	N	L	E	T	G	V	P	P	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	H	F	T	F	T	I	T	S	
k IV 40	.	.	.	A	S	V	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	R	S	
a fw5	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S	
a fw8	.	.	.	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
a fw 10	.	.	.	A	S	S	S	Q	S	G	V	P	S	R	F	R	G	S	E	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	N	
k I 27	.	.	.	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	A	E	F	T	L	T	I	S	S	
k III 25	.	.	.	G	S	I	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S	
a17	.	.	.	V	S	K	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	G	S	
a61	.	.	.	A	S	N	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
a18	.	.	.	A	S	N	L	A	T	G	V	P	A	R	F	S	G	G	G	S	G	.	.	T	H	F	T	F	T	I	S	S	
a34	.	.	.	A	S	H	L	Q	N	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	A	I	S	G	
a45	.	.	.	P	F	S	F	Q	S	G	V	P	S	R	F	R	G	S	G	F	G	.	.	T	D	F	I	L	T	I	S	D	
a64	.	.	.	A	S	I	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	T	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
k IV 98	.	.	.	A	S	S	V	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S	
k II 86A	.	.	.	A	S	N	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	F	T	I	S	S	
a53	.	.	.	A	S	N	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S	G	G	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S	
k II 42	.	.	.	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
k II 114	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	R	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S	
k II 205	.	.	.	A	S	K	L	K	S	G	A	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	Q	F	T	L	T	I	S	S	
k I 65	.	.	.	A	S	N	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
k I 37	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	L	R	F	S	G	S	G	S	E	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S	
k III 23	.	.	.	A	S	H	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	V	S	R	
k IV 25	.	.	.	S	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S	
k I 54	.	.	.	E	S	I	L	Q	A	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	V	L	T	I	S	G	
k II 19	.	.	.	A	S	N	L	Q	T	G	V	P	L	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	F	T	I	S	S	
k I 32	.	.	.	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S	
k I 34	.	.	.	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	N	S	
k I 19	.	.	.	A	S	S	L	E	R	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	F	T	I	N	N	
k I 50	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	S	L	T	I	S	S	
k III 22	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	C	
k I 64	.	.	.	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	T	S	

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AHo	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	
Vκ1																																	
k II 29	A	S	N	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	R	G	T	A	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	N	S
k I 13	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	N	S
k I 9	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
k I 24	A	A	N	L	Q	G	D	V	P	S	T	F	S	G	N	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
k II 124	A	S	S	L	Q	A	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	Y	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	T	S
k II 10	A	S	S	L	Q	G	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S
Vκ3																																	
a41	A	S	T	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	R
a01	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	R
k IV 103	A	T	T	R	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	N	S
k IV 135	T	S	K	R	A	T	G	T	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
k II 190	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	R
k II 136	V	S	N	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
Vκ2																																	
k II 129	V	S	N	R	D	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	K	I	S	R
Vλ1																																	
a15	N	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G
a22	D	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G
a71	N	N	K	R	P	S	G	I	P	G	R	F	S	G	S	R	S	A	.	.	T	S	A	T	L	T	I	T	G
k IV 107	N	T	K	R	P	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	T	L	G	I	T	G
k I 12	N	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G
a65	N	M	Q	R	P	S	G	V	P	E	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G
a58	V	S	K	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	N	T	A	S	L	T	V	S	G
k III 8	N	D	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	R	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	T	G
k III 10	N	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	Y	S	A	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G
a10	N	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G
k II 9a	D	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G
k IV 78	N	N	K	R	P	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	T	L	D	I	T	G
k I 22	D	T	N	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	R	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	T	G
k II 20	N	N	K	R	P	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	T	L	G	I	T	G
k III 20	N	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G
k I 17	Y	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	Q	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AHo	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
Vλ2																																
a47	.	.	.	V	N	N	R	P	A	G	V	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	N	T	A	S	L	T	I	S	G
a59	.	.	.	V	S	N	R	P	S	G	V	S	H	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	N	T	A	S	L	T	I	S	G
a51	.	.	.	V	N	K	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	R	S	G	.	.	S	T	A	S	L	T	I	S	G
a24	.	.	.	V	S	N	R	P	S	G	V	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	N	T	A	S	L	T	I	S	G
k II 87	.	.	.	V	S	K	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	N	T	A	S	L	T	I	S	G
k I 2	.	.	.	T	T	K	K	H	S	W	T	P	A	R	F	S	G	S	L	L	G	.	.	G	R	A	A	L	T	L	S	G
Vλ3																																
a04	.	.	.	D	D	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	.	.	N	T	A	T	L	T	I	S	R
a33	.	.	.	D	S	V	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	.	.	N	T	A	T	L	T	I	S	R
a43	.	.	.	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	.	.	N	T	A	T	L	T	I	R	R
a08	.	.	.	D	S	E	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	.	.	N	T	A	T	L	T	I	S	G
a21	.	.	.	D	S	K	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	.	.	N	T	A	T	L	T	I	S	G
a fw1	.	.	.	N	N	K	R	P	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	P	S	G	.	.	T	T	A	S	L	T	I	S	G
a69	.	.	.	D	S	K	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	.	.	N	T	A	T	L	T	I	S	G
a49	.	.	.	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	.	.	N	T	A	I	L	T	L	S	G
a48	.	.	.	D	N	E	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	T	S	G	.	.	T	T	A	T	L	T	I	S	G
a46	.	.	.	N	S	R	R	P	S	G	I	P	V	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	S	I	A	T	L	T	I	S	E
a60	.	.	.	T	N	T	R	S	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	I	L	G	.	.	N	K	A	A	L	T	I	T	G

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AHo	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127		
Vκ1																																		
a72	L	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	D	N	L	
a02	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	L	Y	S	H	
a44	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	S	S	T	P	
a25	L	E	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	A	Y	R	S	
a68	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	S	T	
a28	L	Q	P	E	D	V	A	T	Y	Y	C	Q	E	Y	D	N	L	P	
a09	L	Q	P	E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	K	F	
a62	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	S	T	
a54	L	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	D	V	L	
k IV 40	L	Q	R	E	D	F	A	T	Y	F	C	Q	Q	S	Y	S	T	
a fw5	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	L	Y	S	H	
a fw8	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	F	S	S	
a fw 10	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	R	T	
k I 27	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	
k III 25	L	Q	P	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	L	
a17	L	Q	P	D	D	L	G	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	T	Y	
a61	L	Q	P	E	D	F	V	S	Y	Y	C	Q	Q	S	F	S	T	
a18	L	Q	P	E	D	V	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	D	N	L	L	P
a34	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	T	F	R	P
a45	L	Q	P	E	D	F	G	V	Y	F	C	Q	Q	T	Y	L	T
a64	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	S	S
k IV 98	L	Q	P	D	D	S	A	T	Y	Y	C	Q	H	Y	D	T	Y	
k II 86A	L	Q	P	A	D	I	G	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	D	N	L
a53	L	Q	P	D	D	F	A	G	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	Y
k II 42	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	D	P	P
k II 114	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	K	Y	N	S	A
k II 205	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	S	Y
k I 65	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	G	T
k I 37	L	Q	P	D	D	S	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	G	Y
k III 23	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	A	R	S
k IV 25	L	Q	P	E	D	F	A	I	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	S	T
k I 54	L	Q	P	D	D	C	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T
k II 19	L	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	D	R
k I 32	L	Q	P	E	D	C	A	T	Y	Y	C	L	Q	H	S	T	Y
k I 34	L	Q	H	E	D	F	A	S	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P
k I 19	L	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	Q	H	Y	H	D	F
k I 50	L	Q	P	E	D	I	G	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	D	D	F
k III 22	L	Q	S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y
k I 64	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	D	Y	N	Y

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AHo	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127															
Vκ1																																															
k II 29	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	F	C	Q	Q	S	D	S	A									
k I 13	L	Q	P	E	D	S	A	T	Y	Y	C	Q	Q	T	S	G	T								
k I 9	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	T	Y	S								
k I 24	L	Q	P	G	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	T	Y	T	T							
k II 124	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	S	S	Y							
k II 10	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	T							
Vκ3																																															
a41	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S						
a01	L	E	P	E	D	Y	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S						
k IV 103	L	Q	S	E	D	F	A	A	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	H	W	P					
k IV 135	L	E	P	E	D	S	A	L	Y	Y	C	Q	Q	R	N	S	W						
k II 190	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S					
k II 136	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	R	S	N	W					
Vκ2																																															
k II 129	V	D	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	G	T	H	W					
Vλ1																																															
a15	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	N		
a22	L	Q	S	E	D	E	A	E	Y	Y	C	A	T	W	D	D	S	L	N	
a71	L	Q	T	G	D	E	A	D	Y	Y	C	G	T	W	D	S	N	L	S	
k IV 107	L	Q	T	G	D	E	A	D	Y	Y	C	G	T	W	D	S	S	L	S	
k I 12	L	R	S	E	D	E	A	H	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	S	
a65	L	Q	S	E	D	E	A	T	Y	Y	C	V	T	W	D	D	S	L	N	
a58	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	S	S	Y	A	G	N	N		
k III 8	L	Q	P	Q	D	E	A	V	Y	F	C	Q	S	Y	D	S	S	L	S	G
k III 10	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	S	
a10	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	N	
k II 9a	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	N	
k IV 78	L	Q	T	E	D	E	A	D	Y	Y	C	G	T	W	D	S	S	L	G	G
k I 22	L	Q	P	Q	D	E	A	V	Y	F	C	Q	S	Y	D	S	S	L	S	G
k II 20	L	Q	T	G	D	E	A	D	Y	Y	C	G	T	W	D	S	S	L	N	
k III 20	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	W	D	D	G	L	N	
k I 17	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	S	

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AH _o	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127											
Vλ2																																											
a47	L	Q	A	E	D	E	A	E	Y	Y	C	S	S	Y	R	S	D	N	S						
a59	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	C	S	Y	R	G	P	S	S					
a51	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	C	S	Y	A	G	R	Y	T					
a24	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	S	S	C	T	S	S	S					
k II 87	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	F	C	C	S	Y	A	G	S	Y	T				
k I 2	V	Q	P	E	D	E	A	E	Y	H	C	L	L	Y	G	G	P					
Vλ3																																											
a04	V	E	A	G	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	V	W	E	S	G	S	G			
a33	V	E	A	G	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	V	W	D	S	S	S	D			
a43	V	E	A	G	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	V	W	D	S	S	S	D		
a08	T	Q	A	M	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	S	N				
a21	T	Q	A	M	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	S					
a fw1	A	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	N	S	R	D	S	S	G	F	
a69	T	Q	A	L	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	T	G			
a49	V	E	A	G	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	V	W	D	N	D	S	D
a48	V	Q	A	E	D	E	G	D	Y	Y	C	Q	S	A	D	N	N	A	A	
a46	T	R	A	L	D	E	A	N	Y	Y	C	Q	A	W	D	S	N		
a60	A	Q	A	D	D	E	S	D	Y	Y	C	V	L	Y	L	G	S	G

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AH _o	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149		
V _K 1																								
a72	P	F	T	F	G	P	G	T	K	V	D	I	K	R
a02	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
a44	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
a25	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
a68	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
a28	P	Y	I	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
a09	P	L	T	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a62	Q	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
a54	P	P	A	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
k IV 40	P	E	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
a fw5	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
a fw8	P	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
a fw 10	P	F	T	F	G	P	G	T	K	V	E	I	K	R
k I 27	Y	W	T	F	G	Q	G	T	K	L	T	V	L	G
k III 25	P	Y	M	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
a17	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	T	V	L	G
a61	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
a18	Q	F	T	F	G	G	G	T	K	V	D	I	K	R
a34	L	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	T	V	L	G
a45	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
a64	L	R	T	F	G	Q	G	T	R	L	E	I	K	R
k IV 98	P	W	T	F	G	L	G	T	K	L	E	I	K	R
k II 86A	P	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
a53	P	W	T	F	G	R	G	T	K	V	D	I	K	R
k II 42	I	F	T	F	G	P	G	T	K	V	E	I	K	R
k II 114	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
k II 205	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
k I 65	F	L	T	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G
k I 37	S	G	T	F	G	Q	G	T	K	V	T	V	L	G
k III 23	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	L	T	V	L	G
k IV 25	P	I	T	F	G	Q	G	T	R	L	E	I	K	R
k I 54	P	W	T	F	G	P	G	T	K	V	D	I	K	R
k II 19	F	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
k I 32	P	P	T	F	G	R	G	T	K	L	E	I	K	R
k I 34	P	W	T	F	G	Q	G	T	R	L	E	I	K	R
k I 19	P	Y	T	F	G	Q	G	T	R	L	E	I	K	R
k I 50	P	L	T	F	G	G	G	T	K	V	D	I	K	R
k III 22	P	F	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
k I 64	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AH _o	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149		
Vκ1																								
k II 29	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
k I 13	P	H	S	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
k I 9	S	C	T	F	G	R	G	T	K	V	T	V	L	G
k I 24	P	R	M	F	G	Q	G	T	K	V	T	V	L	G
k II 124	P	W	T	F	G	P	G	T	K	V	T	V	L	G
k II 10	P	Y	T	F	G	Q	G	T	Q	L	T	V	L	G
Vκ3																								
a41	P	F	T	F	G	P	G	T	K	L	E	I	K	R
a01	P	L	T	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
k IV 103	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
k IV 135	P	H	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R
k II 190	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
k II 136	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
Vκ2																								
k II 129	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	L	T	V	L	G
Vλ1																								
a15	G	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a22	G	Q	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a71	A	A	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
k IV 107	G	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
k I 12	G	W	V	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
a65	H	W	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a58	R	F	L	F	G	G	G	T	Q	L	T	V	L	G
k III 8	S	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
k III 10	A	F	V	F	G	G	G	T	Q	L	T	V	L	G
a10	G	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
k II 9a	G	W	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
k IV 78	G	G	V	F	G	A	G	T	Q	L	T	V	L	G
k I 22	S	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
k II 20	A	Y	V	F	G	T	G	T	K	L	T	V	L	G
k III 20	G	V	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G
k I 17	G	W	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G

Tabla 2 (continuación): Alineamiento de secuencias seleccionadas de dominio VL

AH _o	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149		
Vλ2																								
a47	P	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a59	P	Y	V	F	G	T	G	T	K	L	T	V	L	G
a51	V	F	A	F	G	P	G	T	K	V	T	V	L	G
a24	T	P	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
k II 87	P	Y	V	F	G	T	G	T	K	V	E	I	K	R
k I 2	Q	W	V	F	G	G	G	T	Q	L	T	V	L	G
Vλ3																								
a04	Q	Y	F	F	G	P	G	T	K	L	T	V	L	G
a33	Y	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a43	H	N	V	F	G	S	G	T	K	V	E	I	K	R
a08	T	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a21	T	G	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a fw1	H	L	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	.
a69	T	V	V	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	.
a49	H	W	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a48	H	R	V	F	G	T	G	T	K	L	T	V	L	G
a46	T	V	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
a60	V	W	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G

Tabla 3 (continuación): Alineamiento de miembros aleatorios de biblioteca

AHo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
VL aleatoria																															
k3	E	I	V	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	S	V
k3	D	V	V	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	S	V
k3	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	S	V
k3	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	R	.	.	G	V
k4	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	T	H	C	K	S	S	Q	.	.	S	V
k4	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	H	.	.	N	L
k4	D	I	Q	L	T	Q	S	P	E	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	.	.	S	L
l1	Q	S	V	L	T	Q	.	P	P	S	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	A	G	S	R	.	.	S	N
l2	Q	S	A	L	T	Q	.	P	A	S	V	S	G	S	P	G	Q	S	I	T	I	S	C	T	G	T	S	.	.	S	D
l3	Q	S	V	V	T	Q	.	P	P	S	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	S	S	.	.	S	N
l3	Q	S	V	L	A	Q	.	P	P	S	L	T	V	S	P	G	G	T	V	T	L	T	C	A	S	S	T	.	.	G	A

Tabla 3 (continuación): Alineamiento de miembros aleatorios de biblioteca

AHo	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	
VH aleatoria																																	
1a	S	N	H	S	I	S	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	A	G	F	I	P	.	.	.
1a	S	N	Y	V	I	A	W	V	R	Q	A	P	G	D	G	L	E	W	M	G	A	V	I	P	.	.	.
1a	S	S	Y	G	M	S	W	L	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	V	G	V	V	P	.	.	.	
1b	T	S	Y	N	I	N	W	V	R	Q	A	T	G	Q	G	L	E	W	M	G	R	M	N	P	.	.	.
1b	N	L	Y	D	M	N	W	V	R	Q	A	T	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	M	N	P	.	.	.
1b	S	T	I	Y	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	I	V	I	P	.	.	.
1b	T	K	L	A	F	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	M	Q	T	F	D	P	.	.	.
1b	S	K	S	W	I	T	W	V	R	Q	V	P	G	K	G	L	E	W	M	G	R	I	D	P	.	.	.
1b	S	S	Y	L	I	A	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	V	A	M	I	Y	P	.	.	.
1b	T	T	Y	W	I	N	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	K	I	D	P	.	.	.
1b	T	N	Y	W	I	A	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	Q	W	M	G	I	I	Y	P	.	.	.
1b	S	D	Y	S	F	R	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	T	P	.	.	.
3	P	D	Y	A	I	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	F	V	G	R	V	K	R	N	T	.
3	S	D	A	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	T	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	K	T	.
3	S	N	Y	E	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	V	W	I	S	Y	I	S	S	Y	S	.
3	S	N	Y	D	M	H	W	V	R	Q	A	T	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	D	T	.	.	.
3	G	G	N	Y	I	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	R	L	E	W	V	S	A	I	Y	S	.	.	.
4	S	N	G	G	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	.	.	.	
4	S	S	G	V	Y	Y	W	S	W	L	R	Q	S	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	.	.	.	
4	S	D	Y	Y	W	T	W	I	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	M	G	Y	I	Y	.	.	.	
4	S	S	T	Y	W	S	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	D	V	Y	.	.	.	
4	T	G	S	G	W	W	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	A	E	I	Y	H	.	.	.
4	S	N	N	Y	Y	W	G	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	S	I	Y	H	.	.	.
VL aleatoria																																	
k1	R	N	S	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	E	A	P	K	L	L	I	Y	L	.	.	.		
k1	S	R	A	I	V	W	Y	Q	Q	K	P	G	T	V	P	K	F	L	I	Y	G	.	.	.		
k1	A	R	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	D	.	.	.		
k1	S	S	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	.	.	.		
k1	S	K	Y	I	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	D	.	.	.		
k1	T	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	N	L	L	I	F	D	.	.	.		
k1	S	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	.	.	.		
k1	T	L	L	V	W	Y	Q	Q	R	P	G	E	A	P	T	L	L	I	Y	T	.	.	.			
k1	S	K	Y	V	N	W	Y	Q	Q	R	P	G	R	A	P	Q	L	L	V	Y	V	.	.	.		
k1	R	N	H	L	N	W	Y	Q	Q	R	L	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	.	.	.		
k1	S	S	S	S	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	S	L	L	I	H	G	.	.	.	
k2	L	H	S	N	G	H	N	Y	L	D	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	H	L	L	I	Y	L	.	.
k2	L	Y	T	N	G	Y	N	Y	L	D	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	E	V	L	I	Y	L	.	.

Tabla 3 (continuación): Alineamiento de miembros aleatorios de biblioteca

AHo	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
VH aleatoria																																
1a	I	F	G	S	A	N	Y	A	Q	K	F	R	G	R	V	R	V	S	A	D	E	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S
1a	I	F	G	S	A	K	Y	A	Q	K	F	Q	A	R	V	T	I	I	A	D	K	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	T	S
1a	M	Y	G	T	S	N	N	A	Q	K	F	Q	G	R	V	S	I	T	A	D	T	S	T	N	T	A	Y	L	E	L	S	S
1b	I	T	G	D	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	R	D	T	S	I	R	T	A	Y	M	K	L	S	S
1b	K	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	A	T	M	T	C	D	T	A	T	N	T	A	Y	M	E	L	T	N
1b	S	G	S	T	N	.	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	I	T	M	T	R	D	K	S	T	S	T	V	F	L	E	L	K	T
1b	D	D	A	D	P	L	Y	A	Q	T	F	Q	G	R	V	T	V	T	E	D	P	S	T	D	T	A	S	L	E	L	S	N
1b	S	D	S	Y	I	N	Y	S	P	S	F	Q	G	H	I	T	I	S	H	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S
1b	S	D	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	H	V	T	I	S	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S
1b	T	D	S	E	V	N	Y	S	P	S	F	Q	G	H	V	T	I	S	V	D	K	S	I	D	T	A	F	L	Q	W	S	S
1b	G	D	S	E	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	N	T	A	H	L	Q	W	S	S
1b	I	F	G	S	P	N	Y	A	E	N	F	E	G	K	I	S	I	T	A	D	E	S	T	V	T	V	F	L	E	L	S	S
3	E	G	G	A	I	D	Y	A	A	P	V	E	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	E	N	K	V	Y	L	Q	M	N	S
3	D	A	G	T	I	D	Y	A	A	P	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S
3	.	.	S	T	I	Y	L	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	A	Q	N	S	V	Y	L	Q	M	D	S
3	.	A	G	D	T	Y	Y	P	G	S	V	K	G	R	F	T	M	S	R	E	K	A	R	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S
3	.	G	G	S	T	Y	Y	G	D	S	V	K	G	R	F	S	M	S	R	D	T	S	K	N	T	L	F	L	Q	M	D	R
4	.	S	G	A	T	Y	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	N	L	S	P
4	T	G	T	T	T	Y	Y	N	P	T	L	E	S	R	V	T	I	S	L	D	T	A	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S
4	.	S	G	G	T	H	Y	N	P	S	L	Q	S	R	V	T	I	S	L	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	R	L	F	S
4	.	T	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	L	T	V	D	E	S	K	S	Q	F	S	L	K	L	M	S
4	.	S	G	S	T	H	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	L	T	V	D	K	S	N	N	S	F	S	L	R	L	T	S
4	.	S	G	N	T	H	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	T	S
VL aleatoria																																
k1	.	.	.	A	S	T	L	Q	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	G
k1	.	.	.	A	S	T	S	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S
k1	.	.	.	A	T	T	L	R	G	G	V	P	S	R	F	S	A	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
k1	.	.	.	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
k1	.	.	.	A	S	N	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
k1	.	.	.	T	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
k1	.	.	.	A	S	H	L	E	T	G	V	P	S	R	F	T	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S
k1	.	.	.	A	S	N	L	Q	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	N
k1	.	.	.	A	T	N	L	P	W	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	A	L	T	I	D	N
k1	.	.	.	A	S	T	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	S	F	T	F	T	I	S	S
k1	.	.	.	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	R
k2	.	.	.	G	S	N	R	A	S	G	V	P	D	R	V	G	G	S	G	S	G	.	.	T	H	F	T	L	N	I	S	R
k2	.	.	.	G	S	K	R	A	S	G	V	P	D	R	I	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	R

Tabla 3 (continuación): Alineamiento de miembros aleatorios de biblioteca

AHo	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95		
random VL																																		
k3	.	.	.	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	R		
k3	.	.	.	A	P	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	R		
k3	.	.	.	T	S	N	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	R		
k3	.	.	.	V	S	T	R	A	T	D	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	E	F	T	L	T	I	S	S		
k4	.	.	.	S	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S		
k4	.	.	.	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S		
k4	.	.	.	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	T	I	S	S		
l1	.	.	.	N	N	E	R	A	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	S	L	A	I	S	G		
l2	.	.	.	V	S	N	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	N	T	A	S	L	T	I	S	G		
l3	.	.	.	N	D	K	R	P	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	.	.	T	S	A	T	L	G	I	T	G		
l3	.	.	.	A	R	N	K	H	S	W	T	P	A	R	F	S	G	S	L	L	G	.	.	D	K	A	A	L	T	L	S	G		

Tabla 3 (continuación): Alineamiento de miembros aleatorios de biblioteca

AHo	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127		
VL aleatoria																																		
k3	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S	P
k3	L	E	S	E	D	F	A	V	Y	F	C	Q	Q	Y	T	F	S
k3	V	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	I	S
k3	V	Q	S	E	D	F	A	V	Y	F	C	Q	Q	Y	N	T	W	P
k4	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	D	T
k4	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	H	Q	Y	Y	N	T
k4	L	Q	A	E	D	V	A	L	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	I
I1	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	T	W	D	D	S	L	N
I2	L	Q	A	E	D	E	A	D	F	Y	C	T	S	Y	T	S	S	S
I3	L	Q	T	G	D	E	A	D	Y	Y	C	G	T	W	D	I	S	L	S
I3	V	Q	P	E	D	E	A	E	Y	Y	C	L	L	H	Y	A	G

Tabla 3 (continuación): Alineamiento de miembros aleatorios de biblioteca

AH _o	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149					
VH aleatoria																											
1a	L	D	P	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1a	F	D	I	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1a	P	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1b	S	G	L	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1b	F	K	L	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1b	F	D	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S			
1b	F	D	I	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1b	G	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1b	L	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1b	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1b	L	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
1b	L	E	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
3	S	D	C	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S			
3	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
3	F	D	S	W	G	P	G	T	T	V	T	V	S	S			
3	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
3	F	D	A	W	G	H	G	T	T	V	T	V	S	S			
4	G	P	G	T	T	V	T	V	S	S
4	C	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	S	S	
4	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	
4	F	D	L	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	
4	L	D	S	W	G	L	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	
4	A	Q	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	
VL aleatoria																											
k1	P	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R			
k1	P	L	A	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R			
k1	P	R	T	F	G	Q	E	T	K	V	D	I	K	R			
k1	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R			
k1	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R			
k1	R	F	T	F	G	P	G	T	K	V	D	I	K	R			
k1	L	N	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R			
k1	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R			
k1	G	G	S	F	G	R	G	T	K	V	E	I	K	R			
k1	L	F	T	F	G	P	G	T	K	L	E	I	K	R			
k1	S	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R			
k2	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R			
k2	P	L	T	F	G	G	G	T	K	V	D	I	K	R			

Tabla 3 (continuación): Alineamiento de miembros aleatorios de biblioteca

	AHo	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149		
VL aleatoria																									
k3		R	F	T	F	G	P	G	T	K	L	E	I	K	R
k3		S	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
k3		P	Y	T	F	A	L	G	P	A	G	D	Q	T	W
k3		P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
k4		P	G	T	F	G	Q	G	T	K	V	D	I	K	R
k4		P	Q	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
k4		P	H	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
I1		A	V	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	.
I2		T	Y	V	F	G	P	G	T	K	V	E	I	K	R
I3		A	V	V	F	G	G	G	T	K	L	D	V	L	.
I3		I	W	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	.

Tabla 4:

Estadística de la frecuencia de subgrupos de marcos de buen desempeño seleccionados en el sistema de control de calidad (% de secuencias totales seleccionadas)

dominio VL	VL seleccionada	VL aleatoria
VL κ1	52%	46%
VL κ2	5%	8%
VL κ3	5%	17%
VL κ4	0	12.5%
VL λ1	19%	4%
VL λ2	5%	4%
VL λ3	14%	8%
dominio VH	VH seleccionada	VH aleatoria
VH 1b	19%	39%
VH 1a	9%	13%
VH 2	0	0
VH 3	67%	22%
VH 4	5%	26%
VH 5	0	0%
VH 6	0	0%

Tabla 5: Secuencias del dominio VH y VL usadas para las nuevas combinaciones de marcos			
abb.	origen	subgrupo	secuencia de aminoácidos
1.x	K I 27	Vκ1	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCRASQSISSW LAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFS GSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYKSY WTFGQGTKLTVLG (Seq. Id. No. 1)
2.x	K III25	Vκ1	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQGIRNE LAWYQQRPGKAPKRLIYAGSILQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQPEDVAVYYCQQYYSL PYMFGQGTKVDIKR (Seq. Id. No. 2)
3.x	K IV103	Vκ3	EIVMTQSPATLSVSPGESAAALSCRASQGVST NVAWYQQKPGQAPRLLIYGATTRASGVPA RFGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAAYYCQQY KHWPWFVFGGQTKVEIKR (Seq. Id. No. 3)
4.x	K IV107	Vλ1	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIQDN YVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPSGIPDRF SGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWD SSLSGVVFVGGGQTKLTVLG (Seq. Id. No. 4)
5.x	K IV135	Vκ3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTLTHY LAWYQQKPGQAPRLLIYDTSKRATGVPARF SGSGSGTDFTLTISLQPEDSALYYCQQRNS WPHTFVGGGQTKLEIKR (Seq. Id. No. 5)
6.x	A43	Vλ3	SYVLTQPPSVSVAPGQTATVTCGGNNIGSKS VHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERF SGSNSGNTATLTIRRVEAGDEADYYCQVWD SSSDHNVFVGGGQTKVEIKR (Seq. Id. No. 6)
7.x	A33	Vλ3	LPVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGNNIETISV HWYQQKPGQAPVLVVSDDSVRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDYVVFVGGGQTKLTVLG (Seq. Id. No. 7)

Tabla 5 (continuación)

x.1	A44	VH3	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGST YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAHVLRFLWLPDAFDIWG QGLVTVSS (Seq. Id. No. 8)
x.2	Afw10	VH3	EIVLTQSPSSLSASLGDRVTTTCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSSQSGVPSR FRGSESGTDFLTISNLQPEDFATYYCQQS YRTPFTFGPGTKVEIKR (Seq. Id. No. 9)
x.3	A33	VH1b	VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYSFT GYFLHWVRQAPGQGLEWMGRINPDSGDTI YAQKFQDRVTLTRDTSIGTVYMEITSLTSD DTAVYYCARVPRGTYLDPWDYFDYWGQ GTLVTVSS (Seq. Id. No. 10)
x.4	A43	VH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGST YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDAGIAVAGTGFYDWGQ TLVTVSS (Seq. Id. No. 11)