



No. 13-168686-00000-0000

Fecha: 2013-07-16 16:41:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: LIGANDOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR II DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-BETA.

SOLICITANTE: GLAXO GROUP LIMITED

DIRECCIÓN: 980 Great West Road Brentford, Middlesex TW8 9GS, Reino
Unido.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 16 de Julio de 2013

P2013/000123



No. 13-168886-00000-0000

Fecha: 2013-07-16 16:41:20
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION
Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 5

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000123

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: Glaxo Group Limited

Dirección: 980 Great West Road Brentford,
Middlesex TW8 9GS, Reino Unido.

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido

Lugar de Constitución: Reino Unido

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta

TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2012/050061

Fecha Enero 4, 2012

Publicación Internacional No. WO2012/093125 A1

Fecha Julio 12, 2012

6

Título (54) LIGANDOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR II DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-BETA.

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28.

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Enero 6, 2011

(31) Número de Solicitud

61/430,235

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha _____

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

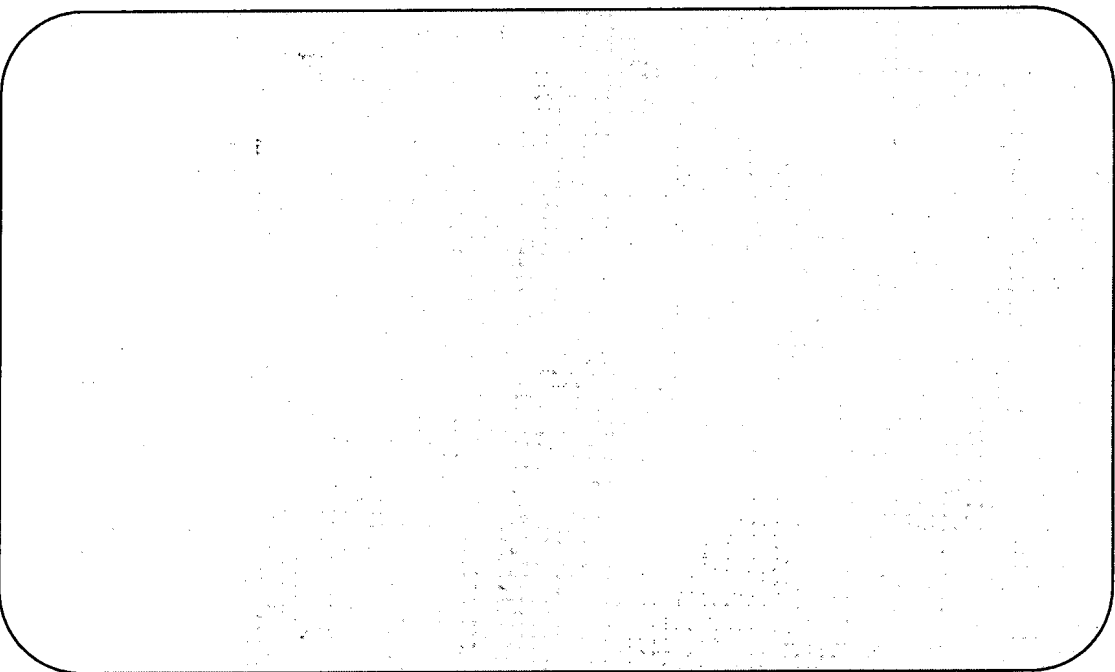
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2012/050061

Andrew BEATON

GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road,
Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
Reino Unido
Nacionalidad: Británica

Caroline DIMECH

GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road,
Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
Reino Unido
Nacionalidad: Británica

Peter Franz ERTL

GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road,
Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
Reino Unido
Nacionalidad: Británica

Susannah Karen FORD

GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road,
Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
Reino Unido
Nacionalidad: Británica

Ruth MCADAM

GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road,
Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
Reino Unido
Nacionalidad: Británica

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0066511

Bogotá D.C., Julio 05 de 2013 - 10:04:18

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	462578852	04/07/2013	10.882.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-168686-00000-0000

Fecha: 2013-07-16 16:41:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 5 de 2013 - 10:04:22

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA <i>RELACIÓN DE ANEXOS</i>	
Dependencia: 2020		Fecha: 13/07/16/ AAAA MM DD	Recorrido: 3
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicator:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13 - 168686 - 0		7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
☒	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
Folio 5 C.D

ce.

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

PI02-F08 (2009-11-18)



No. 13-168686-00000-0000

Fecha: 2013-07-16 16:41:20
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 5

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE

GLAXO GROUP LIMITED

PODER DE REPRESENTACION

Bilingüe inglés- español otorgado en Brentford, Middlesex, Inglaterra el 13 de agosto de 2003 y firmado por Peter John Giddings, Apoderado y Funcionario autorizado.

Certificado de Notario De Pinna en español firmado por James Kerr Milligan

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento Público
2. ha sido firmado por James Kerr Milligan
3. Quien ejerce funciones de Notario público
4. Lleva el sello del Notario público

CERTIFICADO

5. En Londres
6. El 14 agosto 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la Mancomunidad
8. No. G229474
9. Gran Sello de la Oficina de Asuntos exteriores y de la Mancomunidad
10. Firma legible de J. Garbrah- Por el Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no pertenece a la Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961 debe pasar por la sección consular de la Misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 21 agosto-03.

Marlen Neira C


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Ofi.
Inglés - Español - Ingle
Resolución No. 2117 del 7 O

Yo, el infrascrito **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

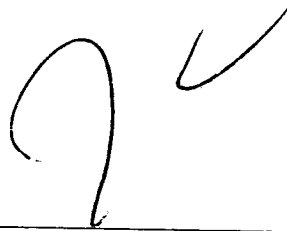
C E R T I F I C O:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **PETER JOHN GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "**GLAXO GROUP LIMITED**", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número **305979**, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

QUE el citado Señor Don **PETER JOHN GIDDINGS** está debidamente autorizado para firmar documentos de esta clase en nombre y representación de dicha Sociedad en virtud de un Poder otorgado por la referida Sociedad fechado 3 de julio de 2002.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy vece de agosto del año dos mil tres.



JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **James Kerr Milligan**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres
6. the/le **14 August 2003**
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **G229474**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **J. Garbrah**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER – TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB
by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents, Utility Models and Industrial Designs** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en

Glaxo Group Limited
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de **Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:


Peter John GIDDINGS as Attorney and Authorised Official

Date/Fecha: 13 August 2003

City/Country/Ciudad,País: Brentford, Middlesex, England



(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/050061

(22) International Filing Date:
4 January 2012 (04.01.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/430,235 6 January 2011 (06.01.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BEATON, Andrew** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). **DIMECH, Caroline** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). **ERTL, Peter, Franz** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). **FORD, Susannah, Karen** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). **MCADAM, Ruth** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB).

(74) Agent: **HARRISON, Anna**; GlaxoSmithKline, Global Patents (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: LIGANDS THAT BIND TGF-BETA RECEPTOR II

(57) Abstract: The disclosure provides an anti -TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain. Suitably, an anti -TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain in accordance with the disclosure is one having an amino acid sequence as set forth in any one of SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 291 having up to 5 amino acid substitutions, deletions or additions. The disclosure further provides a polypeptide and pharmaceutical composition for treating a disease associated with TGFbeta signalling and suitably a disease selected from the group of: tissue fibrosis, such as pulmonary fibrosis, including idiopathic pulmonary fibrosis; liver fibrosis, including cirrhosis and chronic hepatitis; rheumatoid arthritis; ocular disorders; fibrosis of the skin, including keloid of skin; Dupuytren's Contracture; kidney fibrosis such as nephritis and nephrosclerosis; wound healing; scarring reduction; and a vascular condition, such as restenosis.



LIGANDS THAT BIND TGF-BETA RECEPTOR II**Background**

Transforming Growth Factor- β (TGF β ; TGF β (TGF- β)) is a signaling molecule that mediates signal transduction into cells through binding to a TGF β receptor (TGF β R; TGF β R (TGF- β R)).

5 TGF β signaling activity regulates cell differentiation and growth, the nature of its effect, i.e. as cell growth-promoter, growth-suppressor or inducer of other cell functions, being dependent on cell type (see Roberts, et al., The transforming growth factor-betas, Peptide Growth Factors and Their Receptors, Part I, ed. by Sporn, M.B. & Roberts, A.B., Springer-Verlag, Berlin, 1990, p.419-472).

TGF β is produced by a wide variety of cell types, and its cognate receptors are expressed
10 in a wide variety of organs and cells (see Shi and Massague, Cell, Volume 113, Issue 6, 13 June 2003, Pages 685-700; Biol. Signals., Vol. 5, p.232, 1996 and Pulmonary Fibrosis, Vol. 80 of Lung Biology in Health and Disease Series, ed. by Phan, et al., p.627, Dekker, New York, 1995). TGF β receptors have been identified to fall into three types: TGF β RI (TGF β RI) (TGF β type I receptor (Franzen et al., Cell, Vol. 75, No. 4, p. 681, 1993; GenBank Accession No: L11695)); TGF β RII
15 (TGF β RII) (TGF β type II receptor (Herbert et al., Cell, Vol. 68, No. 4, p. 775, 1992; GenBank Accession No: M85079)) and TGF β RIII (TGF β type III receptor (Lopez-Casillas, Cell, Vol. 67, No. 4, p. 785, 1991; GenBank Accession No: L07594)). TGF β RI and TGF β RII have been shown to be essential for the signal transduction of TGF- β (Laiho et al., J. Biol. Chem., Vol. 265, p. 18518, 1990 and Laiho et al., J. Biol. Chem., Vol. 266, p. 9108, 1991), while TGF β RIII is not
20 thought to be essential.

TGF β signaling is mediated through its binding to both TGF β RI and RII. When the ligand binds to the extracellular ligand binding domain, the two receptors are brought together, allowing RII to phosphorylate RI and begin the signaling cascade through the phosphorylation of Smad proteins (see Shi and Massague as referred to above).

25 Three isoforms of TGF β have been identified in mammals: TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3. Each isoform is multifunctional and acts in self-regulatory feedback mechanisms to control bioavailability for developmental processes and to maintain tissue homeostasis (as reviewed in ten Dijke and Arthur, Nature Reviews, Molecular Cell Biology, Vol. 8, Nov. 2007, p. 857-869). Levels of TGF β are controlled by regulation through TGF β expression as well as through
30 binding to proteoglycan, i.e., the extracellular matrix (ECM).

Dysregulated TGF β signaling, such as excess TGF β signaling and high levels of bioavailable TGF β , is implicated in a number of pathologies, including fibroses of various tissues, such as pulmonary fibrosis and cirrhosis, chronic hepatitis, rheumatoid arthritis, ocular disorders, vascular restenosis, keloid of skin, and the onset of nephrosclerosis.

35 Accordingly, there is a need to provide compounds that block or disrupt TGF β signaling in a specific manner, such as through binding to the TGF β receptor II. Such compounds can be used in therapeutics.

Summary

The disclosure relates to an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain. Suitably, an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain in accordance with the disclosure is one which binds to TGFbetaRII with an equilibrium dissociation constant (KD) in the range of 10pM to 50nM, optionally 10pM to 10nM, optionally 100pM to 10nM. In one embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain is one which binds TGFbetaRII with high affinity (high potency) and has an equilibrium dissociation constant of 10pM to 500pM. In one embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain is one which binds TGFbetaRII with an affinity (KD) of approximately 100pM. In one embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain is one which binds TGFbetaRII with an affinity (KD) of less than 100pM. In another embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain is one which binds TGFbetaRII with moderate affinity (low potency) and has an equilibrium dissociation constant of 500pM to 50nM, preferably 500pM to 10nM. In another aspect, the disclosure provides an isolated polypeptide comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain. Suitably, the isolated polypeptide binds to human TGFbetaRII. In another embodiment, the isolated polypeptide also binds to TGFbetaRII derived from a different species such as mouse, dog or monkeys, such as cynomolgus monkeys (cyno). Suitably, the isolated polypeptide binds to both mouse and human TGFbetaRII. Such cross reactivity between TGFbetaRII from humans and other species allows the same antibody construct to be used in an animal disease model, as well as in humans.

In an aspect of the disclosure there is provided an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain having an amino acid sequence as set forth in any one of SEQ ID NO:1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 and 287, and having up to 5 amino acid alterations, wherein each amino acid alteration is an amino acid substitution, deletion or addition i.e. up to 5 amino acid substitutions, deletions or additions, in any combination. In a particular embodiment the amino acid substitutions are conservative substitutions.

In an embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 234 or 279 and having up to 5 amino acid alterations, wherein each amino acid alteration is a an amino acid substitution, deletion or addition. In a particular embodiment, the amino acid alteration(s) are not within CDR3, more specifically not within CDR3 and CDR1, or CDR3 and CDR2, more specifically not within any of the CDRs. In an embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain consists of any one of the following sequences: SEQ ID NO:1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 and 287. In an embodiment the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain consists of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 234 or 236.

It is not intended to cover any specific anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain sequence disclosed in WO 2011012609. For the avoidance of doubt each and every sequence disclosed in WO 2011012609 may be disclaimed from the present invention. In particular DOM23h-271 (SEQ ID NO:4) and DOM-23h-439 (SEQ ID NO:10) as disclosed in WO 2011012609 may be disclaimed. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain consisting of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 199 or 201 herein may be disclaimed.

An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain according to the invention may comprise one or more (e.g. 1, 2, 3, 4, or 5) C-terminal alanine residues. Alternatively, an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain may comprise a C-terminal peptide of up to 5 amino acids in length. In an embodiment, the C-terminal peptide comprises 1, 2, 3, 4, or 5 amino acids.

A person skilled in the art is able to deduce from a given single variable domain sequence, e.g. one having a sequence as set out in any one of SEQ ID NO:1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 and 287 which CDR sequences are contained within them using the various methods outlined herein e.g. CDR sequences as defined by reference to Kabat (1987), Chothia (1989), AbM or contact methods, or a combination of these methods. Suitably, CDR sequences are determined using the method of Kabat described herein. In one embodiment, the CDR sequences of each sequence are those set out in tables 1, 2, 9, and 13.

In an aspect of the invention an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain of the disclosure has 90% or greater than 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-28.

In an aspect of the invention an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain of the disclosure has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-28 with 25 or fewer amino acid changes. In a particular embodiment an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain of the disclosure has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-28 with 20 or fewer, 15 or fewer, 10 or fewer, 9 or fewer, 8 or fewer, 7 or fewer, 6 or fewer, or 5 or fewer amino acid changes.

In an aspect of the disclosure there is provided an isolated polypeptide comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain of the disclosure, in particular an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 and 287 wherein said isolated polypeptide binds to TGFbetaRII.

In an aspect of the disclosure there is provided an isolated polypeptide encoded by a nucleotide sequence that is at least 80% identical to at least one nucleic acid sequence selected from the group of: SEQ ID NOS:39-66, wherein said isolated polypeptide binds to TGFbetaRII.

An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or a polypeptide in accordance with any aspect of the disclosure may comprise any of the following amino acids: R at position 39, I at position 48, D at position 53, N at position 61, R at position 61, K at position 61, R at position 64, F at position 64, D at position 64, E at position 64, Y at position 64, H at position 102, or S at position 103 of the immunoglobulin single variable domain, said position being according to the kabat numbering convention. In one embodiment, the immunoglobulin single variable domain or polypeptide comprises a combination of these amino acids. In another embodiment, the immunoglobulin single variable domain or polypeptide comprises amino acid N at 61 and R at 64. In another embodiment, the immunoglobulin single variable domain or polypeptide comprises amino acid R or K at position 61. In an embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain comprises an I at position 48 in addition to any one of the aforementioned residues at position 61 and/or 64. In these embodiments, the amino acid numbering is that of the immunoglobulin single variable domain, as exemplified, for example, by those sequences given in SEQ ID NOs:1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 and 287.

An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or a polypeptide in accordance with any aspect of the disclosure may comprise one of the following amino acid combinations selected from the group: N at position 61 and R at position 64; R at position 61 and E at position 64; R at position 61 and M at position 64; R at position 61 and F at position 64; R at position 61 and Y at position 64; and R at position 61 and D at position 64 of the immunoglobulin single variable domain. In an embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain comprises an I at position 48 in addition to any one of the aforementioned combination of residues at positions 61 and 64.

In another aspect, there is provided a ligand or binding moiety that has binding specificity for TGFbetaRII and inhibits the binding of an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain comprising an amino acid sequence selected from the group of SEQ ID NOs:1-28 to TGFbetaRII.

In a further aspect of the disclosure, there is provided a fusion protein comprising an immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand in accordance with any aspect of the disclosure.

In one embodiment, the immunoglobulin single variable domain, polypeptide, ligand or fusion protein in accordance with the disclosure is one which neutralises TGFbeta activity. Suitably, the immunoglobulin single variable domain or polypeptide in accordance with the disclosure inhibits binding of TGFbeta to TGFbetaRII. In another embodiment, the immunoglobulin single variable domain or polypeptide in accordance with the disclosure inhibits TGFbeta signalling activity through TGFbetaRII. In another embodiment, the immunoglobulin single variable domain or polypeptide in

accordance with the disclosure suppresses TGFbeta activity, in particular, TGFbeta cell growth activity and/or fibrogenic activity. Suitably, TGFbetaRII is human TGFbetaRII.

5 In one embodiment, the immunoglobulin single variable domain, polypeptide, ligand or fusion protein in accordance with the disclosure is devoid of TGFbetaRII agonist activity at 15 micromolar (μM).

10 In another aspect, there is provided an immunoglobulin single variable domain, polypeptide, ligand or fusion protein in accordance with any aspect of the disclosure further comprising a half-life extending moiety. Suitably, the half-life extending moiety is a polyethylene glycol moiety, serum albumin or a fragment thereof, transferrin receptor or a transferrin-binding portion thereof, or an antibody or antibody fragment comprising a binding site for a polypeptide that enhances half-life *in vivo*. In one embodiment, the half-life extending moiety is an antibody or antibody fragment comprising a binding site for serum albumin or neonatal Fc receptor. In another embodiment, the half-life extending moiety is a dAb, antibody or antibody fragment.

15 In another aspect, the disclosure provides an isolated or recombinant nucleic acid encoding a polypeptide comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide, ligand or fusion protein in accordance with any aspect of the disclosure.

20 In one embodiment, the isolated or recombinant nucleic acid molecule comprises or consists of a nucleic acid molecule selected from the group of any of the nucleic acid molecules having the sequences set out in SEQ ID NOS:39-76,203, 205, 207, 212, 233, 235, 237, 239, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286..

25 In one aspect, the disclosure provides an isolated or recombinant nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a nucleotide sequence that is at least 80% identical to the nucleotide sequence of any of the nucleic acid molecules having the sequences set out in SEQ ID NOS:39-66, and wherein the nucleic acid encodes a polypeptide comprising an immunoglobulin single variable domain that specifically binds to TGFbetaRII.

In another aspect, there is provided a vector comprising a nucleic acid in accordance with the disclosure.

30 In a further aspect, there is provided a host cell comprising a nucleic acid or a vector in accordance with the disclosure. In yet another aspect of the disclosure there is provided a method of producing a polypeptide comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or a polypeptide or ligand or a fusion protein in accordance with the disclosure, the method comprising maintaining a host cell in accordance with the disclosure under conditions suitable for expression of said nucleic acid or vector, whereby a polypeptide comprising an immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand or fusion protein is produced. Optionally, the method further
35 comprises the step of isolating the polypeptide and optionally producing a variant, e.g., a mutated variant, having an improved affinity (K_d); or EC_{50} for TGFbeta neutralization in a standard assay

than the isolated polypeptide. Suitable assays for TGFbeta activity, such as a cell sensor assay, are described herein, for example, in the Examples section.

In one aspect of the disclosure, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand or fusion protein in accordance with the disclosure is for use as a medicament.

5 Accordingly, there is provided a composition comprising anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand or fusion protein in accordance with the disclosure for use as a medicament.

In one aspect of the disclosure, there is provided a use of an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand or fusion protein in accordance with
10 the disclosure for the manufacture of a medicament, particularly for use in treating disease associated with TGFbeta signalling.

Suitably, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand or fusion protein or composition in accordance with the disclosure is for treatment of a disease associated with TGFbeta signaling. Suitably, the disease is a tissue fibrosis, such as pulmonary
15 fibrosis including idiopathic pulmonary fibrosis; liver fibrosis, including cirrhosis and chronic hepatitis; rheumatoid arthritis; ocular disorders; or fibrosis of the skin including keloid of skin; Dupuytren's Contracture; and kidney fibrosis such as nephritis and nephrosclerosis; or a vascular condition such as restenosis. Other diseases associated with TGFbeta signaling include vascular diseases such as hypertension, pre-eclampsia, hereditary haemorrhagic telangiectasia type I
20 (HHT1), HHT2, pulmonary arterial hypertension, aortic aneurysms, Marfan syndrome, familial aneurysm disorder, Loeys-Dietz syndrome, arterial tortuosity syndrome (ATS). Other diseases associated with TGFbeta signaling include diseases of the musculoskeletal system, such as Duchenne's muscular dystrophy and muscle fibrosis. Further diseases associated with TGFbeta signaling include cancer, such as colon, gastric, and pancreatic cancer, as well as glioma and NSCLC.
25 In addition, the disclosure provides methods for targeting cancer by modulating TGFbeta signaling in tumour angiogenesis. Other diseases or conditions include those related to tissue scarring. Other diseases include pulmonary diseases such as COPD (Chronic obstructive pulmonary disease). An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand or fusion protein or composition in accordance with the disclosure may be used in wound healing and/or to prevent or
30 improve the formation of scars. In one aspect, the disclosure provides the anti-TGFbetaRII single variable domain, ligand or antagonist, composition or fusion protein for intradermal delivery. In one aspect, the disclosure provides the anti-TGFbetaRII single variable domain, ligand or antagonist or fusion protein for delivery to the skin of a patient. In one aspect, the disclosure provides the use of the anti-TGFbetaRII single variable domain, ligand or antagonist or fusion protein in the
35 manufacture of a medicament for intradermal delivery. In one aspect, the disclosure provides the use of the anti-TGFbetaRII single variable domain or antagonist or fusion protein in accordance with the disclosure in the manufacture of a medicament for delivery to the skin of a patient.

In one embodiment, the variable domain is substantially monomeric. In a particular embodiment the variable domain is 65%-98% monomeric in solution as determined by SEC-MALS. In another embodiment the variable domain is 65%-100%, 70%-100%, 75%-100%, 80%-100%, 85%-100%, 90%-100%, 95%-100% monomeric in solution as determined by SEC-MALS.

5 In another embodiment, the variable domain, ligand, fusion protein or polypeptide as disclosed herein, particularly when in a pharmaceutical composition, does not contain any one or combination or all of the following post-translational modifications: deamidation, oxidation or glycosylation. In a particular embodiment the variable domain, ligand, fusion protein or polypeptide according to the disclosure does not deamidate.

10 Suitably, the composition is for therapy or prophylaxis of a TGFbeta-mediated condition in a human.

Accordingly, in one embodiment, there is provided an anti-TGFbetaRII dAb for treating fibrosis of the skin, in particular keloid disease or Dupuytren's Contracture. Suitably, the anti-TGFbetaRII dAb is provided as a substantially monomeric dAb for intradermal delivery, preferably
15 lacking any tag (i.e., untagged) such as a myc or another purification tag.

In one aspect, the composition is a pharmaceutical composition and further comprises a pharmaceutically acceptable carrier, excipient or diluent.

In another aspect, there is provided a method of treating and/or preventing an TGFbeta-mediated condition in a human patient, the method comprising administering a composition
20 comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand in accordance with the disclosure the to the patient.

In a further aspect, the disclosure provides an intradermal delivery device containing a composition in accordance with the disclosure. Suitably, such a device is a microneedle or collection of microneedles.

25 An a further aspect, there is provided a kit comprising an anti-TGFbetaRII single variable domain or polypeptide as disclosed herein and a device, such as an intradermal delivery device, for applying said single variable domain or polypeptide to the skin.

Detailed description

30 Within this specification, the disclosure has been described, with reference to embodiments, in a way which enables a clear and concise specification to be written. It is intended and should be appreciated that embodiments may be variously combined or separated without parting from the disclosure.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same
35 meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art (e.g., in cell culture, molecular genetics, nucleic acid chemistry, hybridization techniques and biochemistry). Standard techniques are used for molecular, genetic and biochemical methods (see generally, Sambrook, et al., Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. and Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc., which are incorporated herein by reference) and chemical methods.

Immunoglobulin: As used herein, "immunoglobulin" refers to a family of polypeptides which retain the immunoglobulin fold characteristic of antibody molecules, which contain two β sheets and, usually, a conserved disulphide bond.

Domain: As used herein "domain" refers to a folded protein structure which retains its tertiary structure independently of the rest of the protein. Generally, domains are responsible for discrete functional properties of proteins and in many cases may be added, removed or transferred to other proteins without loss of function of the remainder of the protein and/or of the domain. By single antibody variable domain or immunoglobulin single variable domain is meant a folded polypeptide domain comprising sequences characteristic of antibody variable domains. It therefore includes complete antibody variable domains and modified variable domains, for example in which one or more loops have been replaced by sequences which are not characteristic of antibody variable domains, or antibody variable domains which have been truncated or comprise N- or C-terminal extensions, as well as folded fragments of variable domains which retain at least in part the binding activity and specificity of the full-length domain.

Immunoglobulin single variable domain: The phrase "immunoglobulin single variable domain" refers to an antibody variable domain (V_H , V_{HH} , V_L) or binding domain that specifically binds an antigen or epitope independently of different or other V regions or domains i.e. is monovalent. An immunoglobulin single variable domain can be present in a format (e.g., homo- or hetero-multimer) with other variable regions or variable domains where the other regions or domains are not required for antigen binding by the single immunoglobulin variable domain (i.e., where the immunoglobulin single variable domain binds antigen independently of the additional variable domains). A "domain antibody" or "dAb" is an "immunoglobulin single variable domain" as the term is used herein. A "single antibody variable domain" or an "antibody single variable domain" is the same as an "immunoglobulin single variable domain" as the term is used herein. An immunoglobulin single variable domain is in one embodiment a human antibody variable domain, but also includes single antibody variable domains from other species such as rodent (for example, as disclosed in WO 00/29004, the contents of which are incorporated herein by reference in their entirety), nurse shark and Camelid VHH dAbs. Camelid VHH are immunoglobulin single variable domain polypeptides that are derived from species including camel, llama, alpaca, dromedary, and guanaco, which produce heavy chain antibodies naturally devoid of light chains. The VHH may be humanized.

In all aspects of the disclosure, the immunoglobulin single variable domain is independently selected from antibody heavy chain and light chain single variable domains, e.g. V_H , V_L and V_{HH} .

As used herein an "antibody" refers to IgG, IgM, IgA, IgD or IgE or a fragment (such as a Fab, $F(ab')_2$, Fv, disulphide linked Fv, scFv, closed conformation multispecific antibody, disulphide-

linked scFv, diabody) whether derived from any species naturally producing an antibody, or created by recombinant DNA technology; whether isolated from, for example, serum, B-cells, hybridomas, transfectomas, yeast or bacteria.

Antibody format: In one embodiment, the immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand in accordance with the disclosure can be provided in any antibody format. As used herein, "antibody format" refers to any suitable polypeptide structure in which one or more antibody variable domains can be incorporated so as to confer binding specificity for antigen on the structure. A variety of suitable antibody formats are known in the art, such as, chimeric antibodies, humanized antibodies, human antibodies, single chain antibodies, bispecific antibodies, antibody heavy chains, antibody light chains, homodimers and heterodimers of antibody heavy chains and/or light chains, antigen-binding fragments of any of the foregoing (e.g., a Fv fragment (e.g., single chain Fv (scFv), a disulfide bonded Fv), a Fab fragment, a Fab' fragment, a F(ab')₂ fragment), a single antibody variable domain (e.g., a dAb, V_H, V_{HH}, V_L), and modified versions of any of the foregoing (e.g., modified by the covalent attachment of polyethylene glycol or other suitable polymer or a humanized V_{HH}). In one embodiment, alternative antibody formats include alternative scaffolds in which the CDRs of any molecules in accordance with the disclosure can be grafted onto a suitable protein scaffold or skeleton, such as an affibody, a SpA scaffold, an LDL receptor class A domain, an avimer (see, e.g., U.S. Patent Application Publication Nos. 2005/0053973, 2005/0089932, 2005/0164301) or an EGF domain. Further, the ligand can be bivalent (heterobivalent) or multivalent (heteromultivalent) as described herein. In other embodiments, a "Universal framework" may be used wherein "Universal framework" refers to a single antibody framework sequence corresponding to the regions of an antibody conserved in sequence as defined by Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services) or corresponding to the human germline immunoglobulin repertoire or structure as defined by Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917. The disclosure provides for the use of a single framework, or a set of such frameworks, which has been found to permit the derivation of virtually any binding specificity through variation in the hypervariable regions alone.

In embodiments of the disclosure described throughout this disclosure, instead of the use of an anti-TGFbetaRII "dAb" in a peptide or ligand of the disclosure, it is contemplated that one of ordinary skill in the art can use a polypeptide or domain that comprises one or more or all 3 of the CDRs of a dAb of the disclosure that binds TGFbetaRII (e.g., CDRs grafted onto a suitable protein scaffold or skeleton, e.g. an affibody, an SpA scaffold, an LDL receptor class A domain or an EGF domain). The disclosure as a whole is to be construed accordingly to provide disclosure of polypeptides using such domains in place of a dAb. In this respect, see WO2008096158, the disclosure of which is incorporated by reference.

In one embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain is any suitable immunoglobulin variable domain, and optionally is a human variable domain or a variable

domain that comprises or is derived from a human framework region (e.g., DP47 or DPK9 framework regions).

Antigen: As described herein an "antigen" is a molecule that is bound by a binding domain according to the present disclosure. Typically, antigens are bound by antibody ligands and are capable of raising an antibody response *in vivo*. It may be, for example, a polypeptide, protein, nucleic acid or other molecule.

Epitope: An "epitope" is a unit of structure conventionally bound by an immunoglobulin V_H/V_L pair. Epitopes define the minimum binding site for an antibody, and thus represent the target of specificity of an antibody. In the case of a single domain antibody, an epitope represents the unit of structure bound by a variable domain in isolation.

Binding: Typically, specific binding is indicated by a dissociation constant (K_d) of 50 nanomolar or less, optionally 250 picomolar or less. Specific binding of an antigen-binding protein to an antigen or epitope can be determined by a suitable assay, including, for example, Scatchard analysis and/or competitive binding assays, such as radioimmunoassays (RIA), enzyme immunoassays such as ELISA and sandwich competition assays, and the different variants thereof.

Binding affinity: Binding affinity is optionally determined using surface plasmon resonance (SPR) and BIACORE™ (Karlsson et al., 1991), using a BIACORE™ system (Uppsala, Sweden). The BIACORE™ system uses surface plasmon resonance (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23:1; Morton and Myszka, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) to monitor biomolecular interactions in real time, and uses surface plasmon resonance which can detect changes in the resonance angle of light at the surface of a thin gold film on a glass support as a result of changes in the refractive index of the surface up to 300 nm away. BIACORE™ analysis conveniently generates association rate constants, dissociation rate constants, equilibrium dissociation constants, and affinity constants. Binding affinity is obtained by assessing the association and dissociation rate constants using a BIACORE™ surface plasmon resonance system (BIACORE™, Inc.). A biosensor chip is activated for covalent coupling of the target according to the manufacturer's (BIACORE™) instructions. The target is then diluted and injected over the chip to obtain a signal in response units of immobilized material. Since the signal in resonance units (RU) is proportional to the mass of immobilized material, this represents a range of immobilized target densities on the matrix. Dissociation data are fit to a one-site model to obtain k_{off} +/- s.d. (standard deviation of measurements). Pseudo-first order rate constant (K_d's) are calculated for each association curve, and plotted as a function of protein concentration to obtain k_{on} +/- s.e. (standard error of fit). Equilibrium dissociation constants for binding, K_d's, are calculated from SPR measurements as k_{off}/k_{on}.

Another aspect of the disclosure provides an anti-TGFβ₂ immunoglobulin single variable domain that specifically binds to human TGFβ₂. In one embodiment, the variable domain binds human TGFβ₂ with an equilibrium dissociation constant (K_D) of about 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM or less, optionally about 9, 8, 7, 6 or 5nM or less, optionally about 4 nM or less, about

3 nM or less or about 2 nM or less or about 1 nM or less, optionally about 500pM or less. Suitably, where the variable domain has an equilibrium dissociation constant in the range of about 50nM to 500pM, it is particularly suitable for local administration to a tissue of interest such as the lung. In this embodiment, a high concentration of such a "moderate affinity" binder can be provided as an effective therapeutic. In another embodiment, the variable domain binds human TGFbetaRII with an equilibrium dissociation constant (KD) of about 500pM or less, optionally about 450pM, 400pM, 350pM, 300pM, 250pM, 200pM, 150pM, 100pM, 50pM or less, optionally about 40pM, 30pM, 20pM, 10pM or less. Suitably, where the variable domain has a dissociation constant in the range of about 500pM to 10pM, it is particularly suitable for systemic administration such that the amount in any one tissue of interest is sufficient to provide an effective therapy. In this embodiment, a low concentration of such a "high affinity" binder can be provided as an effective therapeutic.

In one embodiment, single variable domains of the present disclosure show cross-reactivity between human TGFbetaRII and TGFbetaRII from another species, such as mouse TGFbetaRII. In this embodiment, the variable domains specifically bind human and mouse TGFbetaRII. This is particularly useful, since drug development typically requires testing of lead drug candidates in mouse systems before the drug is tested in humans. The provision of a drug that can bind human and mouse species allows one to test results in these system and make side-by-side comparisons of data using the same drug. This avoids the complication of needing to find a drug that works against a mouse TGFbetaRII and a separate drug that works against human TGFbetaRII, and also avoids the need to compare results in humans and mice using non-identical drugs. Cross reactivity between other species used in disease models such as dog or monkey such as cynomolgus monkey is also envisaged.

Optionally, the binding affinity of the immunoglobulin single variable domain for at least mouse TGFbetaRII and the binding affinity for human TGFbetaRII differ by no more than a factor of 10, 50 or 100.

CDRs: The immunoglobulin single variable domains (dAbs) described herein contain complementarity determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3). The locations of CDRs and framework (FR) regions and a numbering system have been defined by Kabat et al. (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). The amino acid sequences of the CDRs (CDR1, CDR2, CDR3) of the V_H (CDRH1 etc.) and V_L (CDRL1 etc.) (V_K) dAbs disclosed herein will be readily apparent to the person of skill in the art based on the well known Kabat amino acid numbering system and definition of the CDRs. According to the Kabat numbering system, the most commonly used method based on sequence variability, heavy chain CDR-H3 have varying lengths, insertions are numbered between residue H100 and H101 with letters up to K (i.e. H100, H100A ... H100K, H101). CDRs can alternatively be determined using the system of Chothia (based on location of the structural loop regions) (Chothia et al., (1989) Conformations of immunoglobulin

hypervariable regions; Nature 342, p877-883), according to AbM (compromise between Kabat and Chothia) or according to the Contact method (based on crystal structures and prediction of contact residues with antigen) as follows. See <http://www.bioinf.org.uk/abs/> for suitable methods for determining CDRs.

5 Once each residue has been numbered, one can then apply the following CDR definitions:

Kabat:

CDR H1: 31-35/35A/35B

CDR H2: 50-65

CDR H3: 95-102

10 CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

CDR L3: 89-97

Chothia:

CDR H1: 26-32

15 CDR H2: 52-56

CDR H3: 95-102

CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

CDR L3: 89-97

20 AbM:

(using Kabat numbering):

(using Chothia numbering):

CDR H1: 26-35/35A/35B

26-35

CDR H2: 50-58

-

CDR H3: 95-102

-

25 CDR L1: 24-34

-

CDR L2: 50-56

-

CDR L3: 89-97

-

Contact:

(using Kabat numbering):

(using Chothia numbering):

30 CDR H1: 30-35/35A/35B

30-35

CDR H2: 47-58

-

CDR H3: 93-101

-

CDR L1: 30-36

-

CDR L2: 46-55

-

("-" means the same numbering as Kabat)

Accordingly, a person skilled in the art is able to deduce from a given single variable domain sequence, e.g. one having a sequence as set out in any one of SEQ ID NO:1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 and 287 which CDR sequences are contained within them using the various methods outlined herein. For example, for a given single variable domain sequence e.g. SEQ ID NO:1 a skilled person is able to determine the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences contained therein using any one or a combination of the CDR definition methods mentioned above. When using the Kabat CDR definition, the skilled person is able to determine that CDR1, CDR2 and CDR 3 sequences are those set forth in SEQ ID NO:77, 113 and 149 respectively. Suitably, CDR sequences are determined using the method of Kabat described herein. In one embodiment, the CDR sequences of each sequence are those set out in tables 1, 2, 9 and 13. In an embodiment a CDR1 sequence is a CDR1 sequence selected from SEQ ID NO:77-112, 241, 244, 247, and 250. In an embodiment a CDR2 sequence is a CDR2 sequence selected from SEQ ID NO:113-148, 242, 245, 248, and 251. In an embodiment a CDR3 sequence is a CDR3 sequence selected from SEQ ID NO:149-184, 243, 246, 249, and 252.

A CDR variant or variant binding unit includes an amino acid sequence modified by at least one amino acid, wherein said modification can be chemical or a partial alteration of the amino acid sequence (for example by no more than 10 amino acids), which modification permits the variant to retain the biological characteristics of the unmodified sequence. For example, the variant is a functional variant which specifically binds to TGFbetaRII. A partial alteration of the CDR amino acid sequence may be by deletion or substitution of one to several amino acids, or by addition or insertion of one to several amino acids, or by a combination thereof (for example by no more than 10 amino acids). The CDR variant or binding unit variant may contain 1, 2, 3, 4, 5 or 6 amino acid substitutions, additions or deletions, in any combination, in the amino acid sequence. The CDR variant or binding unit variant may contain 1, 2 or 3 amino acid substitutions, insertions or deletions, in any combination, in the amino acid sequence. The substitutions in amino acid residues may be conservative substitutions, for example, substituting one hydrophobic amino acid for an alternative hydrophobic amino acid. For example leucine may be substituted with valine, or isoleucine.

TGFbetaRII: As used herein "TGFbetaRII" (transforming growth factor beta type II receptor; TGFβRII) refers to naturally occurring or endogenous mammalian TGFbetaRII proteins and to proteins having an amino acid sequence which is the same as that of a naturally occurring or endogenous corresponding mammalian TGFbetaRII protein (e.g., recombinant proteins, synthetic proteins (i.e., produced using the methods of synthetic organic chemistry)). Accordingly, as defined herein, the term includes mature TGFbetaRII protein, polymorphic or allelic variants, and other isoforms of TGFbetaRII and modified or unmodified forms of the foregoing (e.g., lipidated,

glycosylated). Naturally occurring or endogenous TGFbetaRII includes wild type proteins such as mature TGFbetaRII, polymorphic or allelic variants and other isoforms and mutant forms which occur naturally in mammals (e.g., humans, non-human primates). Such proteins can be recovered or isolated from a source which naturally expresses TGFbetaRII, for example. These proteins and proteins having the same amino acid sequence as a naturally occurring or endogenous corresponding TGFbetaRII, are referred to by the name of the corresponding mammal. For example, where the corresponding mammal is a human, the protein is designated as a human TGFbetaRII. Human TGFbetaRII is described, for example, by Lin, et al., Cell 1992, Vol. 68(4), p.775-785 and GenBank Accession No. M85079.

Human TGFbetaRII is a transmembrane receptor consisting of 567 amino acids with an extracellular domain of approximately 159 amino acids, a transmembrane domain and a cytoplasmic domain which comprises a protein kinase domain for signal transduction.

As used herein "TGFbetaRII" also includes a portion or fragment of TGFbetaRII. In one embodiment, such a portion or fragment includes the extracellular domain of TGFbetaRII or a portion thereof.

By "anti-TGFbetaRII" with reference to an immunoglobulin single variable domain, polypeptide, ligand, fusion protein or so forth is meant a moiety which recognises and binds TGFbetaRII. In one embodiment an "anti-TGFbetaRII" specifically recognises and/or specifically binds to the protein TGFbetaRII, and, suitably, human TGFbetaRII. In another embodiment, the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain in accordance with the disclosure also binds to mouse TGFbetaRII (GenBank accession number NM_029575; described, for example in Massague et al., Cell 69 (7), 1067-1070 (1992)).

"TGFbeta" includes isoforms such as TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3.

TGFbeta binds TGFbetaRII and, in a complex with TGFbetaRI initiates a signaling pathway. Accordingly, TGFbeta activity and inhibition or neutralization of TGFbeta activity can be determined through any assay which measures an output of TGFbeta signaling. TGFbeta signaling is reviewed, for example in Itoh, et al., Eur. J. Biochem 2000, Vol. 267, p.6954; Dennler, et al., Journal of Leucocyte Biol. 2002, 71(5), p. 731-40. Thus, TGFbeta activity can be tested in a number of different assays familiar to the person skilled in the art. "Inhibition" or "Neutralization" means that a biological activity of TGFbeta is reduced either totally or partially in the presence of the immunoglobulin single variable domain of the present disclosure in comparison to the activity of TGFbeta in the absence of such immunoglobulin single variable domain.

In one embodiment, an inhibition or neutralisation of TGFbeta activity is tested in an IL-11 release assay. In this embodiment, the ability of the immunoglobulin single variable domain in accordance with the disclosure is tested for its ability to inhibit human TGFbeta1 (TGFbeta1; TGF- β 1) stimulated IL-11 release from cells such as A549 cells. TGFbeta1 (TGF- β 1) binds directly to TGFbetaRII (TGF- β RII) and induces the assembly of the TGFbetaRI/RII (TGF- β RI/II) complex.

TGFBetaRI (TGF- β RI) is phosphorylated and is able to signal through several pathways including the Smad 4 pathway. Activation of the Smad 4 pathway results in the release of IL-11. The IL-11 is secreted into the cell supernatant and is then measured by colourmetric ELISA. Suitable IL-11 release assays are described herein, such as the Human IL-11 Quantikine ELISA assay kit supplied by R & D systems (ref. D1100).

In another embodiment, TGFBeta activity is tested in an assay for the ability of the immunoglobulin single variable domain in accordance with the disclosure to inhibit TGFBeta-induced expression of CAGA-luciferase in MC3T3-E1 cells in a MC3T3-E1 luciferase assay. Three copies of a TGFBeta-responsive sequence motif, termed a CAGA box are present in the human PAI-1 promoter and specifically binds Smad3 and 4 proteins. Cloning multiple copies of the CAGA box into a luciferase reporter construct confers TGFBeta responsiveness to cells transfected with the reporter system. One suitable assay is described herein and uses MC3T3-E1 cells (mouse osteoblasts) stably transfected with a [CAGA]₁₂-luciferase reporter construct (Dennler, et al., (1998) EMBO J. 17, 3091–3100).

Other suitable assays include a human SBE beta-lactamase cell assay (INVITROGEN®, cell sensor assay). Examples of suitable assays are described herein.

Suitably, the immunoglobulin single variable domain, polypeptide, ligand or fusion protein in accordance with the disclosure does not, itself activate TGFBetaRII receptor signalling. Accordingly, in one embodiment, the immunoglobulin single variable domain, polypeptide, ligand or fusion protein in accordance with the disclosure is devoid of agonist activity at 10 μ M. Agonist activity can be determined by testing a compound of interest in a TGFBetaRII assay as described herein in the absence of TGFBeta. Where TGFBeta is absent, agonist activity of a compound of interest would be detected by detecting TGFBetaRII signalling.

Homology: Sequences similar or homologous (e.g., at least about 70% sequence identity) to the sequences disclosed herein are also part of the disclosure. In some embodiments, the sequence identity at the amino acid level can be about 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or higher. At the nucleic acid level, the sequence identity can be about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or higher. Alternatively, substantial identity exists when the nucleic acid segments will hybridize under selective hybridization conditions (e.g., very high stringency hybridization conditions), to the complement of the strand. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or in a partially purified or substantially pure form.

As used herein, the terms "low stringency," "medium stringency," "high stringency," or "very high stringency" conditions describe conditions for nucleic acid hybridization and washing. Guidance for performing hybridization reactions can be found in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, which is incorporated herein by reference in its entirety. Aqueous and nonaqueous methods are described in that reference and either can be used. Specific

hybridization conditions referred to herein are as follows: (1) low stringency hybridization conditions in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by two washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at least at 50°C (the temperature of the washes can be increased to 55°C for low stringency conditions); (2) medium stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 60°C; (3) high stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65°C; and optionally (4) very high stringency hybridization conditions are 0.5M sodium phosphate, 7% SDS at 65°C, followed by one or more washes at 0.2X SSC, 1% SDS at 65°C. Very high stringency conditions (4) are the preferred conditions and the ones that should be used unless otherwise specified.

Calculations of "homology" or "sequence identity" or "similarity" between two sequences (the terms are used interchangeably herein) are performed as follows. The sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-homologous sequences can be disregarded for comparison purposes). In one embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least about 30%, optionally at least about 40%, optionally at least about 50%, optionally at least about 60%, and optionally at least about 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% of the length of the reference sequence. The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "homology" is equivalent to amino acid or nucleic acid "identity"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

Amino acid and nucleotide sequence alignments and homology, similarity or identity, as defined herein are optionally prepared and determined using the algorithm BLAST 2 Sequences, using default parameters (Tatusova, T. A. et al., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999)). Alternatively, the BLAST algorithm (version 2.0) is employed for sequence alignment, with parameters set to default values. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) is the heuristic search algorithm employed by the programs blastp, blastn, blastx, tblastn, and tblastx; these programs ascribe significance to their findings using the statistical methods of Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2264-8.

Ligand: As used herein, the term "ligand" refers to a compound that comprises at least one peptide, polypeptide or protein moiety that has a binding site with binding specificity for TGFbetaRII. A ligand can also be referred to as a "binding moiety".

The ligands or binding moieties according to the disclosure optionally comprise immunoglobulin variable domains which have different binding specificities, and do not contain variable domain pairs which together form a binding site for target compound (i.e., do not comprise an immunoglobulin heavy chain variable domain and an immunoglobulin light chain variable domain that together form a binding site for TGFbetaRII). Optionally, each domain which has a binding site that has binding specificity for a target is an immunoglobulin single variable domain (e.g., immunoglobulin single heavy chain variable domain (e.g., V_H, V_{HH}), immunoglobulin single light chain variable domain (e.g., V_L)) that has binding specificity for a desired target (e.g., TGFbetaRII).

Thus, "ligands" include polypeptides that comprise two or more immunoglobulin single variable domains wherein each immunoglobulin single variable domain binds to a different target. Ligands also include polypeptides that comprise at least two immunoglobulin single variable domains or the CDR sequences of the single variable domains that bind different targets in a suitable format, such as an antibody format (e.g., IgG-like format, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂) or a suitable protein scaffold or skeleton, such as an affibody, a SpA scaffold, an LDL receptor class A domain, an EGF domain, avimer and dual- and multi-specific ligands as described herein.

The polypeptide domain which has a binding site that has binding specificity for a target (e.g., TGFbetaRII) can also be a protein domain comprising a binding site for a desired target, e.g., a protein domain is selected from an affibody, a SpA domain, an LDL receptor class A domain, an avimer (see, e.g., U.S. Patent Application Publication Nos. 2005/0053973, 2005/0089932, 2005/0164301). If desired, a "ligand" can further comprise one or more additional moieties that can each independently be a peptide, polypeptide or protein moiety or a non-peptidic moiety (e.g., a polyalkylene glycol, a lipid, a carbohydrate). For example, the ligand can further comprise a half-life extending moiety as described herein (e.g., a polyalkylene glycol moiety, a moiety comprising albumin, an albumin fragment or albumin variant, a moiety comprising transferrin, a transferrin fragment or transferrin variant, a moiety that binds albumin, a moiety that binds neonatal Fc receptor).

Competes: As referred to herein, the term "competes" means that the binding of a first target (e.g., TGFbetaRII) to its cognate target binding domain (e.g., immunoglobulin single variable domain) is inhibited in the presence of a second binding domain (e.g., immunoglobulin single variable domain) that is specific for said cognate target. For example, binding may be inhibited sterically, for example by physical blocking of a binding domain or by alteration of the structure or environment of a binding domain such that its affinity or avidity for a target is reduced. See WO2006038027 for details of how to perform competition ELISA and competition BIACORE™ experiments to determine competition between first and second binding domains, the details of which are incorporated herein by reference to provide explicit disclosure for use in the present disclosure. The disclosure includes antigen binding proteins, specifically single variable domains, polypeptides, ligands and fusion proteins, that compete with any one of single variable domains of

SEQ ID NO:1-38. In a particular embodiment there is provided a TGFbetaRII binding protein which competes with any one of single variable domains of SEQ ID NO:1-38 and also has a KD of 50nM or less to TGFbetaRII. In a particular embodiment the KD is between 10pM and 50nM. In a particular embodiment, the KD is between 10pM and 10nM. In a particular embodiment, the KD is between 100pM and 10nM. In a particular embodiment the KD is approximately 100pM.

TGFbeta signaling: Suitably, the single variable domain, polypeptide or ligand of the disclosure can neutralize TGFbeta signaling through TGFbetaRII. By "neutralizing", it is meant that the normal signaling effect of TGFbeta is blocked such that the presence of TGFbeta has a neutral effect on TGFbetaRII signaling. Suitable methods for measuring a neutralizing effect include assays for TGFbeta signaling as described herein. In one embodiment, neutralization is observed as a % inhibition of TGFbeta activity in a TGFbeta signaling assay. In one embodiment, the single variable domain or polypeptide binds to the extracellular domain of TGFbetaRII thereby inhibiting/blocking the binding of TGFbeta to the extracellular domain of TGFbetaRII. Suitably, the single variable domain or polypeptide is useful where there is an excess of bioavailable TGFbeta and the single variable domain or polypeptide serves to inhibit the signaling activity of the bioavailable TGFbeta through inhibiting binding of TGFbeta to its cognate receptor TGFbetaRII.

As used herein, the term "antagonist of TGFbetaRII" or "anti-TGFbetaRII antagonist" or the like refers to an agent (e.g., a molecule, a compound) which binds TGFbetaRII and can inhibit a (i.e., one or more) function of TGFbetaRII. For example, an antagonist of TGFbetaRII can inhibit the binding of TGFbeta to TGFbetaRII and/or inhibit signal transduction mediated through TGFbetaRII. Accordingly, TGFbeta-mediated processes and cellular responses can be inhibited with an antagonist of TGFbetaRII.

In one embodiment, the ligand (e.g., immunoglobulin single variable domain) that binds TGFbetaRII inhibits binding of TGFbeta to a TGFbetaRII receptor with an inhibitory concentration 50 (IC50) that is $\leq$ about 10 μ M, $\leq$ about 1 μ M, $\leq$ about 100 nM, $\leq$ about 50 nM, $\leq$ about 10 nM, $\leq$ about 5 nM, $\leq$ about 1 nM, $\leq$ about 500 pM, $\leq$ about 300 pM, $\leq$ about 100 pM, or $\leq$ about 10 pM. In a particular embodiment, an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain of the disclosure has an IC50 of 15 μ M or less. The IC50 is optionally determined using an *in vitro* TGFbeta receptor binding assay, or cell assay, such as the assay described herein.

It is also contemplated that the ligand (e.g., immunoglobulin single variable domain) optionally inhibit TGFbetaRII induced functions in a suitable *in vitro* assay with a neutralizing dose 50 (ND50) that is $\leq$ about 10 μ M, $\leq$ about 1 μ M, $\leq$ about 100 nM, $\leq$ about 50 nM, $\leq$ about 10 nM, $\leq$ about 5 nM, $\leq$ about 1 nM, $\leq$ about 500 pM, $\leq$ about 300 pM, $\leq$ about 100 pM, $\leq$ about 10 pM, $\leq$ about 1 pM $\leq$ about 500 fM, $\leq$ about 300 fM, $\leq$ about 100 fM, $\leq$ about 10 fM. In a particular embodiment, an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain of the disclosure achieves greater than 40% neutralisation of TGF- β .

"dual-specific ligand": In one embodiment, the immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand in accordance with the disclosure can be part of a "dual-specific ligand" which refers to a ligand comprising a first antigen or epitope binding site (e.g., first immunoglobulin single variable domain) and a second antigen or epitope binding site (e.g., second immunoglobulin single variable domain), wherein the binding sites or variable domains are capable of binding to two antigens (e.g., different antigens or two copies of the same antigen) or two epitopes on the same antigen which are not normally bound by a monospecific immunoglobulin. For example, the two epitopes may be on the same antigen, but are not the same epitope or sufficiently adjacent to be bound by a monospecific ligand. In one embodiment, dual-specific ligands according to the disclosure are composed of binding sites or variable domains which have different specificities, and do not contain mutually complementary variable domain pairs (i.e. V_H/V_L pairs) which have the same specificity (i.e., do not form a unitary binding site).

In one embodiment, a "dual-specific ligand" may bind to TGFbetaRII and to another target molecule. For example, another target molecule may be a tissue-specific target molecule such that the dual-specific ligand of the disclosure enables an anti-TGFbetaRII polypeptide or immunoglobulin single variable domain in accordance with the disclosure to be targeted to a tissue of interest. Such tissues include lung, liver and so forth.

Multispecific dAb multimers are also provided. This includes a dAb multimer comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain according to any aspect of the disclosure and one or more single variable domains each of which binds to a different target (e.g. a target other than TGFbetaRII). In an embodiment a bispecific dAb multimer is provided e.g. a dAb multimer comprising one or more anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domains according to any aspect of the disclosure and one or more dAbs which bind to a second, different target. In an embodiment a trispecific dAb multimer is provided.

The ligands of the disclosure (e.g., polypeptides, dAbs and antagonists) can be formatted as a fusion protein that contains a first immunoglobulin single variable domain that is fused directly to a second immunoglobulin single variable domain. If desired such a format can further comprise a half-life extending moiety. For example, the ligand can comprise a first immunoglobulin single variable domain that is fused directly to a second immunoglobulin single variable domain that is fused directly to an immunoglobulin single variable domain that binds serum albumin.

Generally, the orientation of the polypeptide domains that have a binding site with binding specificity for a target, and whether the ligand comprises a linker, is a matter of design choice. However, some orientations, with or without linkers, may provide better binding characteristics than other orientations. All orientations (e.g., dAb1-linker-dAb2; dAb2-linker-dAb1) are encompassed by the disclosure are ligands that contain an orientation that provides desired binding characteristics can be easily identified by screening.

Polypeptides and dAbs according to the disclosure, including dAb monomers, dimers and trimers, can be linked to an antibody Fc region, comprising one or both of C_H2 and C_H3 domains, and optionally a hinge region. For example, vectors encoding ligands linked as a single nucleotide sequence to an Fc region may be used to prepare such polypeptides. In an embodiment there is provided a dAb-Fc fusion.

The disclosure moreover provides dimers, trimers and polymers of the aforementioned dAb monomers.

Target: As used herein, the phrase "target" refers to a biological molecule (e.g., peptide, polypeptide, protein, lipid, carbohydrate) to which a polypeptide domain which has a binding site can bind. The target can be, for example, an intracellular target (e.g., an intracellular protein target), a soluble target (e.g., a secreted), or a cell surface target (e.g., a membrane protein, a receptor protein). In one embodiment, the target is TGFβ₂RII. In another embodiment, the target is TGFβ₂RII extracellular domain.

Complementary: As used herein "complementary" refers to when two immunoglobulin domains belong to families of structures which form cognate pairs or groups or are derived from such families and retain this feature. For example, a V_H domain and a V_L domain of an antibody are complementary; two V_H domains are not complementary, and two V_L domains are not complementary. Complementary domains may be found in other members of the immunoglobulin superfamily, such as the Vα and Vβ (or γ and δ) domains of the T-cell receptor. Domains which are artificial, such as domains based on protein scaffolds which do not bind epitopes unless engineered to do so, are non-complementary. Likewise, two domains based on (for example) an immunoglobulin domain and a fibronectin domain are not complementary.

"Affinity" and "avidity" are terms of art that describe the strength of a binding interaction. With respect to the ligands of the disclosure, avidity refers to the overall strength of binding between the targets (e.g., first target and second target) on the cell and the ligand. Avidity is more than the sum of the individual affinities for the individual targets.

Nucleic acid molecules, vectors and host cells: The disclosure also provides isolated and/or recombinant nucleic acid molecules encoding ligands (single variable domains, fusion proteins, polypeptides, dual-specific ligands and multispecific ligands) as described herein.

Nucleic acids referred to herein as "isolated" are nucleic acids which have been separated away from the nucleic acids of the genomic DNA or cellular RNA of their source of origin (e.g., as it exists in cells or in a mixture of nucleic acids such as a library), and include nucleic acids obtained by methods described herein or other suitable methods, including essentially pure nucleic acids, nucleic acids produced by chemical synthesis, by combinations of biological and chemical methods, and recombinant nucleic acids which are isolated (see e.g., Daugherty, B.L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A.P. and J.S. Crowe, Gene, 101: 297-302 (1991)).

Nucleic acids referred to herein as "recombinant" are nucleic acids which have been produced by recombinant DNA methodology, including those nucleic acids that are generated by procedures which rely upon a method of artificial recombination, such as the polymerase chain reaction (PCR) and/or cloning into a vector using restriction enzymes.

5 In certain embodiments, the isolated and/or recombinant nucleic acid comprises a nucleotide sequence encoding an immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand, as described herein, wherein said ligand comprises an amino acid sequence that has at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 91%, at least about 92%, at least about 93%, at least about 94%, at least about 95%, at least about 96%, at least about 97%, at least about 98%,
10 or at least about 99% amino acid sequence identity with the amino acid sequence of a dAb that binds TGFbetaRII disclosed herein, e.g. amino acid sequences set out in any of SEQ ID NOS: 1-38. Nucleotide sequence identity can be determined over the whole length of the nucleotide sequence that encodes the selected anti-TGFbetaRII dAb. In an embodiment the nucleic acid sequence comprises or consists of a nucleic acid sequence at least 80% identical to of any one of SEQ ID
15 NO:39-66. In an embodiment the nucleic acid sequence comprises or consists of a nucleic acid sequence of any one of SEQ ID NO:39-76.

Embodiments of the disclosure also provide codon optimized nucleotide sequences encoding polypeptides and variable domains as disclosed herein e.g. optimised for expression in bacterial, mammalian or yeast cells.

20 The disclosure also provides a vector comprising a recombinant nucleic acid molecule of the disclosure. In certain embodiments, the vector is an expression vector comprising one or more expression control elements or sequences that are operably linked to the recombinant nucleic acid of the disclosure. The disclosure also provides a recombinant host cell comprising a recombinant nucleic acid molecule or vector of the disclosure. Suitable vectors (e.g., plasmids, phagemids),
25 expression control elements, host cells and methods for producing recombinant host cells of the disclosure are well-known in the art, and examples are further described herein.

Suitable expression vectors can contain a number of components, for example, an origin of replication, a selectable marker gene, one or more expression control elements, such as a transcription control element (e.g., promoter, enhancer, terminator) and/or one or more translation
30 signals, a signal sequence or leader sequence, and the like. Expression control elements and a signal sequence, if present, can be provided by the vector or other source. For example, the transcriptional and/or translational control sequences of a cloned nucleic acid encoding an antibody chain can be used to direct expression.

A promoter can be provided for expression in a desired host cell. Promoters can be
35 constitutive or inducible. For example, a promoter can be operably linked to a nucleic acid encoding an antibody, antibody chain or portion thereof, such that it directs transcription of the nucleic acid. A variety of suitable promoters for prokaryotic (e.g., lac, tac, T3, T7 promoters for E. coli) and

eukaryotic (e.g., Simian Virus 40 early or late promoter, Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter, cytomegalovirus promoter, adenovirus late promoter) hosts are available.

In addition, expression vectors typically comprise a selectable marker for selection of host cells carrying the vector, and, in the case of a replicable expression vector, an origin of replication.

5 Genes encoding products which confer antibiotic or drug resistance are common selectable markers and may be used in prokaryotic (e.g., lactamase gene (ampicillin resistance), Tet gene for tetracycline resistance) and eukaryotic cells (e.g., neomycin (G418 or geneticin), gpt (mycophenolic acid), ampicillin, or hygromycin resistance genes). Dihydrofolate reductase marker genes permit selection with methotrexate in a variety of hosts. Genes encoding the gene product of auxotrophic markers of the host (e.g., LEU2, URA3, HIS3) are often used as selectable markers in yeast. Use of viral (e.g., baculovirus) or phage vectors, and vectors which are capable of integrating into the genome of the host cell, such as retroviral vectors, are also contemplated. Suitable expression vectors for expression in mammalian cells and prokaryotic cells (*E. coli*), insect cells (*Drosophila* Schnieder S2 cells, Sf9) and yeast (*P. methanolica*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) are well-known in the art.

Suitable host cells can be prokaryotic, including bacterial cells such as *E. coli*, *B. subtilis* and/or other suitable bacteria; eukaryotic cells, such as fungal or yeast cells (e.g., *Pichia pastoris*, *Aspergillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), or other lower eukaryotic cells, and cells of higher eukaryotes such as those from insects (e.g., *Drosophila* Schnieder S2 cells, Sf9 insect cells (WO 94/26087 (O'Connor)), mammals (e.g., COS cells, such as COS-1 (ATCC Accession No. CRL-1650) and COS-7 (ATCC Accession No. CRL-1651), CHO (e.g., ATCC Accession No. CRL-9096, CHO DG44 (Urlaub, G. and Chasin, LA., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7):4216-4220 (1980))), 293 (ATCC Accession No. CRL-1573), HeLa (ATCC Accession No. CCL-2), CV1 (ATCC Accession No. CCL-70), WOP (Dailey, L., et al., J. Virol., 54:739-749 (1985), 3T3, 293T (Pear, W. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:8392-8396 (1993)) NS0 cells, SP2/0, HuT 78 cells and the like, or plants (e.g., tobacco). (See, for example, Ausubel, F.M. et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993). In some embodiments, the host cell is an isolated host cell and is not part of a multicellular organism (e.g., plant or animal). In certain embodiments, the host cell is a non-human host cell.

30 The disclosure also provides a method for producing a ligand (e.g., dual-specific ligand, multispecific ligand) of the disclosure, comprising maintaining a recombinant host cell comprising a recombinant nucleic acid of the disclosure under conditions suitable for expression of the recombinant nucleic acid, whereby the recombinant nucleic acid is expressed and a ligand is produced. In some embodiments, the method further comprises isolating the ligand.

35 Reference is made to WO200708515, page 161, line 24 to page 189, line 10 for details of disclosure that is applicable to embodiments of the present disclosure. This disclosure is hereby incorporated herein by reference as though it appears explicitly in the text of the present disclosure

and relates to the embodiments of the present disclosure, and to provide explicit support for disclosure to incorporated into claims below. This includes disclosure presented in WO200708515, page 161, line 24 to page 189, line 10 providing details of the "Preparation of Immunoglobulin Based Ligands", "Library vector systems", "Library Construction", "Combining Single Variable
5 Domains", "Characterisation of Ligands", "Structure of Ligands", "Skeletons", "Protein Scaffolds", "Scaffolds for Use in Constructing Ligands", "Diversification of the Canonical Sequence" and "Therapeutic and diagnostic compositions and uses", as well as definitions of "operably linked", "naive", "prevention", "suppression", "treatment", "allergic disease", "Th2-mediated disease", "therapeutically-effective dose" and "effective".

10 The phrase, "half-life" refers to the time taken for the serum concentration of the immunoglobulin single variable domain, polypeptide or ligand to reduce by 50%, *in vivo*, for example due to degradation of the ligand and/or clearance or sequestration of the ligand by natural mechanisms. The ligands of the disclosure can be stabilized *in vivo* and their half-life increased by binding to molecules which resist degradation and/or clearance or sequestration. Typically, such
15 molecules are naturally occurring proteins which themselves have a long half-life *in vivo*. The half-life of a ligand is increased if its functional activity persists, *in vivo*, for a longer period than a similar ligand which is not specific for the half-life increasing molecule. Thus a ligand specific for HSA and a target molecules is compared with the same ligand wherein the specificity to HSA is not present, that is does not bind HSA but binds another molecule. Typically, the half-life is increased by 10%,
20 20%, 30%, 40%, 50% or more. Increases in the range of 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x or more of the half-life are possible. Alternatively, or in addition, increases in the range of up to 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x of the half life are possible.

Formats: Increased half-life can be useful in *in vivo* applications of immunoglobulins, especially antibodies and most especially antibody fragments of small size. Such fragments (Fvs,
25 disulphide bonded Fvs, Fabs, scFvs, dAbs) are generally rapidly cleared from the body. dAbs, polypeptides or ligands in accordance with the disclosure can be adapted to provide increased half-life *in vivo* and consequently longer persistence times in the body of the functional activity of the ligand.

Methods for pharmacokinetic analysis and determination of ligand half-life will be familiar to
30 those skilled in the art. Details may be found in Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). Reference is also made to "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. ex edition (1982), which describes pharmacokinetic parameters such as t alpha and t beta half lives and area under the curve (AUC).

35 Half lives ($t_{1/2}$ alpha and $t_{1/2}$ beta) and AUC can be determined from a curve of serum concentration of ligand against time. The WINNONLIN™ analysis package (available from Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA) can be used, for example, to model the curve. In a first

phase (the alpha phase) the ligand is undergoing mainly distribution in the patient, with some elimination. A second phase (beta phase) is the terminal phase when the ligand has been distributed and the serum concentration is decreasing as the ligand is cleared from the patient. The t_{α} half life is the half life of the first phase and the t_{β} half life is the half life of the second phase. Thus, in one embodiment, the present disclosure provides a ligand or a composition comprising a ligand according to the disclosure having a t_{α} half life in the range of 15 minutes or more. In one embodiment, the lower end of the range is 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours, 5 hours, 6 hours, 7 hours, 10 hours, 11 hours or 12 hours. In addition, or alternatively, a ligand or composition according to the disclosure will have a t_{α} half life in the range of up to and including 12 hours. In one embodiment, the upper end of the range is 11, 10, 9, 8, 7, 6 or 5 hours. An example of a suitable range is 1 to 6 hours, 2 to 5 hours or 3 to 4 hours.

In one embodiment, the present disclosure provides a ligand (polypeptide, dAb or antagonist) or a composition comprising a ligand according to the disclosure having a t_{β} half life in the range of about 2.5 hours or more. In one embodiment, the lower end of the range is about 3 hours, about 4 hours, about 5 hours, about 6 hours, about 7 hours, about 10 hours, about 11 hours, or about 12 hours. In addition, or alternatively, a ligand or composition according to the disclosure has a t_{β} half life in the range of up to and including 21 days. In one embodiment, the upper end of the range is about 12 hours, about 24 hours, about 2 days, about 3 days, about 5 days, about 10 days, about 15 days or about 20 days. In one embodiment a ligand or composition according to the disclosure will have a t_{β} half life in the range about 12 to about 60 hours. In a further embodiment, it will be in the range about 12 to about 48 hours. In a further embodiment still, it will be in the range about 12 to about 26 hours.

In addition, or alternatively to the above criteria, the present disclosure provides a ligand or a composition comprising a ligand according to the disclosure having an AUC value (area under the curve) in the range of about 1 mg•min/ml or more. In one embodiment, the lower end of the range is about 5, about 10, about 15, about 20, about 30, about 100, about 200 or about 300 mg•min/ml. In addition, or alternatively, a ligand or composition according to the disclosure has an AUC in the range of up to about 600 mg•min/ml. In one embodiment, the upper end of the range is about 500, about 400, about 300, about 200, about 150, about 100, about 75 or about 50 mg•min/ml. In one embodiment a ligand according to the disclosure will have a AUC in the range selected from the group consisting of the following: about 15 to about 150 mg•min/ml, about 15 to about 100 mg•min/ml, about 15 to about 75 mg•min/ml, and about 15 to about 50 mg•min/ml.

Polypeptides and dAbs of the disclosure and antagonists comprising these can be formatted to have a larger hydrodynamic size, for example, by attachment of a PEG group, serum albumin, transferrin, transferrin receptor or at least the transferrin-binding portion thereof, an antibody Fc region, or by conjugation to an antibody domain. For example, polypeptides dAbs and antagonists

formatted as a larger antigen-binding fragment of an antibody or as an antibody (e.g., formatted as a Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv).

As used herein, "hydrodynamic size" refers to the apparent size of a molecule (e.g., a protein molecule, ligand) based on the diffusion of the molecule through an aqueous solution. The diffusion or motion of a protein through solution can be processed to derive an apparent size of the protein, where the size is given by the "Stokes radius" or "hydrodynamic radius" of the protein particle. The "hydrodynamic size" of a protein depends on both mass and shape (conformation), such that two proteins having the same molecular mass may have differing hydrodynamic sizes based on the overall conformation of the protein.

Hydrodynamic size of the ligands (e.g., dAb monomers and multimers) of the disclosure may be determined using methods which are well known in the art. For example, gel filtration chromatography may be used to determine the hydrodynamic size of a ligand. Suitable gel filtration matrices for determining the hydrodynamic sizes of ligands, such as cross-linked agarose matrices, are well known and readily available.

The size of a ligand format (e.g., the size of a PEG moiety attached to a dAb monomer), can be varied depending on the desired application. For example, where ligand is intended to leave the circulation and enter into peripheral tissues, it is desirable to keep the hydrodynamic size of the ligand low to facilitate extravasation from the blood stream. Alternatively, where it is desired to have the ligand remain in the systemic circulation for a longer period of time the size of the ligand can be increased, for example by formatting as an Ig like protein.

Half-life extension by targeting an antigen or epitope that increases half-life *in vivo*: The hydrodynamic size of a ligand and its serum half-life can also be increased by conjugating or associating an TGFbetaRII binding polypeptide, dAb or ligand of the disclosure to a binding domain (e.g., antibody or antibody fragment) that binds an antigen or epitope that increases half-life *in vivo*, as described herein. For example, the TGFbetaRII binding agent (e.g., polypeptide) can be conjugated or linked to an anti-serum albumin or anti-neonatal Fc receptor antibody or antibody fragment, e.g. an anti-SA or anti-neonatal Fc receptor dAb, Fab, Fab' or scFv, or to an anti-SA affibody or anti-neonatal Fc receptor Affibody or an anti-SA avimer, or an anti-SA binding domain which comprises a scaffold selected from, but not limited to, the group consisting of CTLA-4, lipocalin, SpA, an affibody, an avimer, GroEl and fibronectin (see WO2008096158 for disclosure of these binding domains, which domains and their sequences are incorporated herein by reference and form part of the disclosure of the present text). Conjugating refers to a composition comprising polypeptide, dAb or antagonist of the disclosure that is bonded (covalently or noncovalently) to a binding domain such as a binding domain that binds serum albumin.

Typically, a polypeptide that enhances serum half-life *in vivo* is a polypeptide which occurs naturally *in vivo* and which resists degradation or removal by endogenous mechanisms which remove unwanted material from the organism (e.g., human). For example, a polypeptide that

enhances serum half-life *in vivo* can be selected from proteins from the extracellular matrix, proteins found in blood, proteins found at the blood brain barrier or in neural tissue, proteins localized to the kidney, liver, lung, heart, skin or bone, stress proteins, disease-specific proteins, or proteins involved in Fc transport. Suitable polypeptides are described, for example, in WO2008/096158.

5 Such an approach can also be used for targeted delivery of a single variable domain, polypeptide or ligand in accordance with the disclosure to a tissue of interest. In one embodiment targeted delivery of a high affinity single variable domain in accordance with the disclosure is provided.

10 dAbs that Bind Serum Albumin: The disclosure in one embodiment provides a polypeptide or antagonist (e.g., dual specific ligand comprising an anti-TGFbetaRII dAb (a first dAb)) that binds to TGFbetaRII and a second dAb that binds serum albumin (SA), the second dAb binding SA. Details of dual specific ligands are found in WO03002609, WO04003019, WO2008096158 and WO04058821.

15 In particular embodiments of the ligands and antagonists, the dAb binds human serum albumin and competes for binding to albumin with a dAb selected from the group consisting of any of the dAb sequences disclosed in WO2004003019 (which sequences and their nucleic acid counterpart are incorporated herein by reference and form part of the disclosure of the present text), any of the dAb sequences disclosed in WO2007080392 (which sequences and their nucleic acid counterpart are incorporated herein by reference and form part of the disclosure of the present text), any of the dAb sequences disclosed in WO2008096158 (which sequences and their nucleic acid counterpart are incorporated herein by reference and form part of the disclosure of the present text).

25 In certain embodiments, the dAb binds human serum albumin and comprises an amino acid sequence that has at least about 80%, or at least about 85%, or at least about 90%, or at least about 95%, or at least about 96%, or at least about 97%, or at least about 98%, or at least about 99% amino acid sequence identity with the amino acid sequence of a dAb described in any of WO2004003019, WO2007080392 or WO2008096158. For example, the dAb that binds human serum albumin can comprise an amino acid sequence that has at least about 90%, or at least about 95%, or at least about 96%, or at least about 97%, or at least about 98%, or at least about 99% amino acid sequence identity with the amino acid sequence of any of these dAbs. In certain embodiments, the dAb binds human serum albumin and comprises an amino acid sequence that has at least about 80%, or at least about 85%, or at least about 90%, or at least about 95%, or at least about 96%, or at least about 97%, or at least about 98%, or at least about 99% amino acid sequence identity with the amino acid sequence of the amino acid sequence of any of these dAbs.

35 In more particular embodiments, the dAb is a V_k dAb that binds human serum albumin. In more particular embodiments, the dAb is a V_H dAb that binds human serum albumin.

Suitable Camelid V_{HH} that bind serum albumin include those disclosed in WO2004041862 (Ablynx N.V.) and in WO2007080392 (which V_{HH} sequences and their nucleic acid counterpart are incorporated herein by reference and form part of the disclosure of the present text). In certain embodiments, the Camelid V_{HH} binds human serum albumin and comprises an amino acid sequence that has at least about 80%, or at least about 85%, or at least about 90%, or at least about 95%, or at least about 96%, or at least about 97%, or at least about 98%, or at least about 99% amino acid sequence identity with those sequences disclosed in WO2007080392 or any one of SEQ ID NOS:518-534, these sequence numbers corresponding to those cited in WO2007080392 or WO 2004041862.

In an alternative embodiment, the antagonist or ligand comprises a binding moiety specific for TGFβ₂ (e.g., human TGFβ₂), wherein the moiety comprises non-immunoglobulin sequences as described in WO2008096158, the disclosure of these binding moieties, their methods of production and selection (e.g., from diverse libraries) and their sequences are incorporated herein by reference as part of the disclosure of the present text).

Conjugation to a half-life extending moiety (e.g., albumin): In one embodiment, a (one or more) half-life extending moiety (e.g., albumin, transferrin and fragments and analogues thereof) is conjugated or associated with the TGFβ₂-binding polypeptide, dAb or antagonist of the disclosure. Examples of suitable albumin, albumin fragments or albumin variants for use in a TGFβ₂-binding format are described in WO2005077042, which disclosure is incorporated herein by reference and forms part of the disclosure of the present text.

Further examples of suitable albumin, fragments and analogs for use in a TGFβ₂-binding format are described in WO 03076567, which disclosure is incorporated herein by reference and which forms part of the disclosure of the present text.

Where a (one or more) half-life extending moiety (e.g., albumin, transferrin and fragments and analogues thereof) is used to format the TGFβ₂-binding polypeptides, dAbs and antagonists of the disclosure, it can be conjugated using any suitable method, such as, by direct fusion to the TGFβ₂-binding moiety (e.g., anti- TGFβ₂ dAb), for example by using a single nucleotide construct that encodes a fusion protein, wherein the fusion protein is encoded as a single polypeptide chain with the half-life extending moiety located N- or C-terminally to the TGFβ₂ binding moiety. Alternatively, conjugation can be achieved by using a peptide linker between moieties, e.g., a peptide linker as described in WO03076567 or WO2004003019 (these linker disclosures being incorporated by reference in the present disclosure to provide examples for use in the present disclosure).

Conjugation to PEG: In other embodiments, the half-life extending moiety is a polyethylene glycol moiety. In one embodiment, the antagonist comprises (optionally consists of) a single variable domain of the disclosure linked to a polyethylene glycol moiety (optionally, wherein said moiety has a size of about 20 to about 50 kDa, optionally about 40 kDa linear or branched PEG).

Reference is made to WO04081026 for more detail on PEGylation of dAbs and binding moieties. In one embodiment, the antagonist consists of a dAb monomer linked to a PEG, wherein the dAb monomer is a single variable domain according to the disclosure.

In another embodiment, a single variable domain, ligand or polypeptide in accordance with the disclosure may be linked to a toxin moiety or toxin.

Protease resistance: Single variable domains, polypeptides or ligands in accordance with the disclosure can be modified to improve their resistance to protease degradation. As used herein, a peptide or polypeptide (e.g. a domain antibody (dAb)) that is "resistant to protease degradation" is not substantially degraded by a protease when incubated with the protease under conditions suitable for protease activity. A polypeptide (e.g., a dAb) is not substantially degraded when no more than about 25%, no more than about 20%, no more than about 15%, no more than about 14%, no more than about 13%, no more than about 12%, no more than about 11%, no more than about 10%, no more than about 9%, no more than about 8%, no more than about 7%, no more than about 6%, no more than about 5%, no more than about 4%, no more than about 3%, no more than about 2%, no more than about 1%, or substantially none of the protein is degraded by protease after incubation with the protease for about one hour at a temperature suitable for protease activity. For example at 37 or 50 degrees C. Protein degradation can be assessed using any suitable method, for example, by SDS-PAGE or by functional assay (e.g., ligand binding) as described herein.

Methods for generating dAbs with enhanced protease resistance are disclosed, for example, in WO2008149143. In one embodiment, the single variable domain, polypeptide or ligand in accordance with the disclosure is resistant to degradation by leucozyme and/or trypsin. Polypeptides, immunoglobulin single variable domains and ligands of the disclosure may be resistant to one or more of the following: serine protease, cysteine protease, aspartate proteases, thiol proteases, matrix metalloprotease, carboxypeptidase (e.g., carboxypeptidase A, carboxypeptidase B), trypsin, chymotrypsin, pepsin, papain, elastase, leucozyme, pancreatin, thrombin, plasmin, cathepsins (e.g., cathepsin G), proteinase (e.g., proteinase 1, proteinase 2, proteinase 3), thermolysin, chymosin, enteropeptidase, caspase (e.g., caspase 1, caspase 2, caspase 4, caspase 5, caspase 9, caspase 12, caspase 13), calpain, ficain, clostripain, actinidain, bromelain, and separase. In particular embodiments, the protease is trypsin, elastase or leucozyme. The protease can also be provided by a biological extract, biological homogenate or biological preparation. Polypeptides, immunoglobulin single variable domains and ligands as disclosed herein may be selected in the presence of lung proteases, such that said polypeptides, immunoglobulin single variable domains and ligands are resistant to said lung proteases. In one embodiment, the protease is a protease found in sputum, mucus (e.g., gastric mucus, nasal mucus, bronchial mucus), bronchoalveolar lavage, lung homogenate, lung extract, pancreatic extract, gastric fluid, saliva. In one embodiment, the protease is one found in the eye and/or tears. Examples of such proteases found in the eye

include caspases, calpains, matrix metalloproteases, disintegrin, metalloproteinases (e.g. ADAMs – a disintegrin and metalloproteinase) and ADAM with thrombospondin motifs, the proteosomes, tissue plasminogen activator, secretases, cathepsin B and D, cystatin C, serine protease PRSS1, ubiquitin proteasome pathway (UPP). In one embodiment, the protease is a non bacterial protease. In an
5 embodiment, the protease is an animal, e.g., mammalian, e.g., human, protease. In an embodiment, the protease is a GI tract protease or a pulmonary tissue protease, e.g., a GI tract protease or a pulmonary tissue protease found in humans. Such protease listed here can also be used in the methods described, for example, in WO2008149143, involving exposure of a repertoire of library to a protease.

10 Stability: In one aspect of the disclosure, the polypeptides, single variable domains, dAbs, ligands, compositions or formulations of the disclosure are substantially stable after incubation (at a concentration of polypeptide or variable domain of 1mg/ml) at 37 to 50 °C for 14 days in Britton Robinson or PBS buffer. In one embodiment, at least 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% of the polypeptide, antagonist or variable domain etc. remains
15 unaggregated after such incubation at 37 degrees C. In one embodiment, at least 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% of the polypeptide or variable domain remains monomeric after such incubation at 37 degrees C.

In one embodiment, at least 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% of the polypeptide, antagonist or variable
20 domain remains unaggregated after such incubation at 50 degrees C. In one embodiment, at least 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% of the polypeptide or variable domain remains monomeric after such incubation at 50 degrees C. In one embodiment, no aggregation of the polypeptides, variable domains, antagonists is seen after any one of such incubations. In one embodiment, the pI of the polypeptide
25 or variable domain remains unchanged or substantially unchanged after incubation at 37 degrees C at a concentration of polypeptide or variable domain of 1mg/ml in Britton-Robinson buffer. In one aspect of the disclosure, the polypeptides, variable domains, antagonists, compositions or formulations of the disclosure are substantially stable after incubation (at a concentration of polypeptide or variable domain of 100mg/ml) at 4 °C for 7 days in Britton Robinson buffer or PBS at
30 a pH of 7 to 7.5 (e.g., at pH7 or pH7.5). In one embodiment, at least 95, 95.5, 96, 96.5, 97, 97.5, 98, 98.5, 99 or 99.5% of the polypeptide, antagonist or variable domain remains unaggregated after such incubation. In one embodiment, at least 95, 95.5, 96, 96.5, 97, 97.5, 98, 98.5, 99 or 99.5% of the polypeptide or variable domain remains monomeric after such incubation. In one embodiment, no aggregation of the polypeptides, variable domains, antagonists is seen after any one of such
35 incubations.

In one aspect of the disclosure, the polypeptides, variable domains, antagonists, compositions or formulations of the disclosure are substantially stable after nebulisation (e.g. at a

concentration of polypeptide or variable domain of 40mg/ml) e.g., at room temperature, 20 degrees C or 37°C, for 1 hour, e.g. jet nebuliser, e.g. in a Pari LC+ cup. In one embodiment, at least 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95.5, 96, 96.5, 97, 97.5, 98, 98.5, 99 or 99.5% of the polypeptide, antagonist or variable domain remains unaggregated after such nebulisation. In one embodiment, at least 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95.5, 96, 96.5, 97, 97.5, 98, 98.5, 99 or 99.5% of the polypeptide or variable domain remains monomeric after such nebulisation. In one embodiment, no aggregation of the polypeptides, variable domains, antagonists is seen after any one of such nebulisation.

Monomeric form: In one embodiment, the dAb of the present disclosure is identified to be preferentially monomeric. Suitably, the disclosure provides a (substantially) pure monomer. In one embodiment, the dAb is at least 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% pure or 100% pure monomer. To determine whether dAbs are monomeric or form higher order oligomers in solution, they can be analysed by SEC-MALLS. SEC MALLS (size exclusion chromatography with multi-angle-LASER-light-scattering) is a non-invasive technique for the characterizing of macromolecules in solution, that is familiar to any skilled in the art. Briefly, proteins (at concentration of 1mg/mL in buffer Dulbecco's PBS) are separated according to their hydrodynamic properties by size exclusion chromatography (column: TSK3000; S200). Following separation, the propensity of the protein to scatter light is measured using a multi-angle-LASER-light-scattering (MALLS) detector. The intensity of the scattered light while protein passes through the detector is measured as a function of angle. This measurement taken together with the protein concentration determined using the refractive index (RI) detector allows calculation of the molar mass using appropriate equations (integral part of the analysis software Astra v.5.3.4.12).

Therapeutic use: The disclosure provides a method for treating, suppressing or preventing diseases associated with TGFbeta signaling. In one embodiment, such disease may be caused or contributed to by dysregulated TGFbeta signaling, by overexpression of TGFbeta or by high levels of bioavailable TGFbeta. Diseases associated with TGFbeta signaling include diseases relating to fibroses of various tissues, such as pulmonary fibrosis including idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and other interstitial lung disease such as acute respiratory distress syndrome (ARDS), fibrosis of the liver including cirrhosis and chronic hepatitis, rheumatoid arthritis, ocular disorders, vascular conditions such as restenosis, fibrosis of the skin including keloid of skin and scarring following wound healing and Dupuytren's Contracture, and kidney such as nephritis, kidney fibrosis and nephrosclerosis or a vascular condition such as restenosis. Other diseases associated with TGFbeta signaling include vascular diseases such as hypertension, pre-eclampsia, hereditary haemorrhagic telangiectasia type I (HHT1), HHT2, pulmonary arterial hypertension, aortic aneurysms, Marfan syndrome, familial aneurysm disorder, Loeys-Dietz syndrome, arterial tortuosity syndrome (ATS). Other diseases associated with TGFbeta signaling include diseases of the musculoskeletal system such as Duchenne's muscular dystrophy and muscle fibrosis. Further diseases associated with

TGFbeta signaling include cancer such as colon, gastric and pancreatic cancer as well as glioma and NSCLC. In addition, the disclosure provides methods for targeting cancer by, for example, modulating TGFbeta signaling in the tumour angiogenesis or through treatment of the cancer stroma. Other diseases or conditions include those related to tissue scarring. Other diseases include pulmonary diseases such as COPD (Chronic obstructive pulmonary disease), liver diseases such as liver failure (e.g. viral hepatitis, alcohol, obesity, autoimmune, metabolic, obstructive), kidney diseases including renal failure (e.g. diabetes, hypertension), hypertrophic cardiomyopathy, transplant rejection (lung/liver/kidney) and hypertrophic and keloid scarring.

"Fibrosis" is the result of excess deposition of extracellular matrix components such as collagen causing overgrowth, scarring and/or hardening of tissues.

"Skin Fibrosis": cutaneous fibrosis covers a variety of human disorders with differing aetiology, but with a common dysregulation of connective tissue metabolism, particularly of dermal fibroblasts. Specific examples of cutaneous fibrosis include keloid disease, hypertrophic scars (HS) and scleroderma. Keloid disease and hypertrophic scars, although not subgroups of the same condition are both resultant from scarring following wound healing, with Keloids spreading beyond the original wound site whilst hypertrophic scar is constrained within the margins of the original wound. Scleroderma, however is used to describe fibrosis of the skin in systemic sclerosis which is a systemic condition resulting in fibrosis of multiple organs. In an embodiment, the variable domain, ligand, fusion protein or polypeptide as disclosed herein is used to prevent or treat keloid disease, hypertrophic scars or scleroderma.

"Keloids" are fibrous overgrowths at sites of cutaneous injury that form as a result of an abnormal wound-healing process in genetically susceptible individuals and, unlike normal scars, do not regress. Predominantly observed in patients with darkly pigmented skin, "Keloid disease" is a benign dermal fibroproliferative tumor unique to humans that never becomes malignant.

"Dupuytren's contracture" is a localized formation of scar tissue beneath the skin of the palm of the hand. The scarring accumulates in a tissue (fascia) that normally covers the tendons that pull the fingers to grip. As Dupuytren contracture progresses, more of the fascia becomes thickened and shortened, resulting in flexion contracture of the hand where the fingers bend towards the palm and cannot be fully extended (straightened), resulting in extreme cases to loss of use of the hand.

Scarring occurs following, surgery, injury or trauma to tissues or organs within the body. They are a consequence of repair mechanisms that generate extracellular matrix to replace missing normal tissue. The skin represents the most frequently injured tissue resulting in dermal scarring, which can result in adverse consequences including: loss of function; contracture; and, poor aesthetics which may have cause psychological effects to the sufferer. Scars can be defined 'a macroscopic disturbance of the normal structure and function of the skin architecture, resulting from the end product of wound healing' (Fergusson et al., 1996). Currently no therapies exist to prevent or improve scarring effectively.

The role of TGFbeta in pulmonary fibrosis has been observed (Wynn et al., J. Pathology 2008, 214, p.199-210; Sime et al. J. Clinical Immunology 1997, Vol.100, p. 768-776). A shift to increased production of Th2 cytokines and decreased production of Th1 cytokines is observed as a result of unknown lung injury. Overexpression of TGFbeta stimulates angiogenesis, fibroblast
5 activation, deposition of ECM, and fibrogenesis. Animal models (e.g. TGFbeta overexpression, SMAD3 KO, inhibition of TGFbetaR signaling) show that TGFbeta is a key mediator for the development of pulmonary fibrosis.

"Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)" is a chronic and progressive disease resulting in abnormal and excessive deposition of fibrotic tissue in the pulmonary interstitium without a known
10 cause. There is an incidence of approximately 10-20 cases per 100,000 in U.S per year. The prevalence increases sharply with age, reaching 175 cases per 100,000 over the age of 75 with onset usually occurring between 50 and 70 yrs. The five year survival rate is 20% with a mean survival of 2.8 years. Symptoms include a dry cough and progressive breathlessness, abnormal chest x-ray or HRCT and reduced lung volumes. Current treatments include corticosteroids
15 (Prednisone), immunosuppressives (cyclophosphamide) or transplantation although none of the currently available therapies have a proven efficacy. In one embodiment, the single variable domain or polypeptide of the present disclosure provides a treatment for IPF.

Suitably, a successful treatment for Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) will show any one of a decrease in lung fibroblast proliferation, an increase in lung fibroblast apoptosis, a decrease in
20 excessive extracellular matrix synthesis and deposition, an increase in extracellular matrix breakdown and remodelling or will show some protection against ongoing tissue injury and restoration of normal histopathology.

Suitably, a successful treatment would decelerate disease progression.

The efficacy of a treatment for IPF can be demonstrated in the bleomycin induced
25 pulmonary fibrosis model. In one embodiment, the immunoglobulin single variable domain of the present disclosure cross reacts with mouse TGFbetaRII such that its efficacy can be tested in the mouse model.

TGFbeta is an important cell signaling molecule in the modulation of cell behaviour in ocular tissues. Overactivation of TGFbeta is implicated in the pathogenesis of fibrotic diseases in eye tissue
30 which can be wound healing-related and lead to impaired vision and ocular tissue homeostasis (reviewed, for example, by Saika, Laboratory Investigation (2006), 86, 106-115).

Accordingly, in one embodiment, diseases associated with TGFbeta signaling include ocular disorders such as fibrotic diseases of the eye tissue. Fibrotic disease of the eye may occur in the cornea, conjunctiva, lens or retina. Ocular disorders include proliferative vitreoretinopathy (PVR), a
35 disorder of post-retinal detachment and retinal fibrosis, diabetic retinopathy, glaucoma, such as open-angle glaucoma, angle-closure, congenital and pseudo-exfoliation syndrome, wound healing reactions in the lens, such as post chemical or thermal burn, or Stevens-Johnson's syndrome, and

post-cataract surgery complications. TGFbeta also has a role in cataract development (Wormstone et al. Exp Eye Res; 83 1238-1245, 2006). A number of ocular disorders occur as a result of fibrosis post surgery. In addition, over activity of TGFbeta2 (transforming growth factor β 2) is believed to cause scarring in and around the eye after glaucoma filtration surgery. TGFbeta2 is the predominant isoform involved in pathological scarring of ocular tissues including the cornea, retina, conjunctiva and trabecular meshwork. Scarring or fibrosis of the trabecular meshwork can lead to occlusion of the normal aqueous outflow pathway leading to raised intraocular pressure and risk of glaucoma development. TGFbeta 2 has been shown to be a pathological agent in pre-clinical models of glaucoma disease. TGFbeta2 levels are elevated in patients with glaucoma, *in vitro* treatment of huTM cells with TGFbeta-2 leads to phenotypic changes and upregulation of ECM modulating proteins (MMP-2, PAI-I) (Lutjen-Drecol (2005), Experimental Eye Research, Vol. 81, Issue 1, pages 1-4; Liton (2005), Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 337, issue 4, p.1229-1236; Fuchshofer et al (2003), Experimental Eye Research, Vol. 77, issue 6, p. 757-765; Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) conference poster #1631 2009). Moreover, overexpression of TGFbeta in the eye leads to glaucoma-like pathology in mice (ARVO conference poster #5108 2009) and delivery of TGFbeta-2 using AAV has been shown to inhibit retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma (ARVO conference poster #5510 2009). More recently, oxidative stress induction in cultured human optic nerve head astrocytes has been shown to increase TGFbeta2 secretion (Yu et al (2009) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: 1707-1717). This all indicates that reduction of TGFbeta 2 levels might minimize the characteristic optic nerve head changes seen in glaucoma. However, TGFbeta is also known to have an immunosuppressive role and so in some aspects can be protective so a reduction in elevated levels of TGFbeta2 rather than a complete knock down may be preferred in treatment of chronic ocular conditions such as glaucoma. Accordingly, diseases which can be treated using the dAbs and compositions etc. in accordance with the disclosure include scarring post glaucoma filtration surgery.

Accordingly, in one aspect there is provided a method for treating, suppressing or preventing a disease associated with TGFbeta signaling and, in particular, dysregulated TGFbeta signaling, comprising administering to a mammal in need thereof a therapeutically-effective dose or amount of a polypeptide, fusion protein, single variable domain, antagonist or composition according to the disclosure.

In another aspect, the disclosure provides an immunoglobulin single variable domain, polypeptide, ligand or fusion protein in accordance with the disclosure for use as a medicament. Suitable a medicament may comprise an immunoglobulin single variable domain etc. in accordance with the disclosure formatted as described herein.

Suitably, the medicament is a pharmaceutical composition. In a further aspect of the disclosure, there is provided a composition (e.g., pharmaceutical composition) comprising a polypeptide, single variable domain, ligand, composition or antagonist according to the disclosure

and a physiologically or pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient. In one embodiment, the composition comprises a vehicle for delivery. In particular embodiments, the polypeptide, fusion protein, single variable domain, antagonist or composition is administered via pulmonary delivery, such as by inhalation (e.g., intrabronchial, intranasal or oral inhalation, intranasal such as by drops) or by systemic delivery (e.g., parenteral, intravenous, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intrathecal, intraarticular, subcutaneous, vaginal or rectal administration). In another embodiment, the polypeptide, single variable domain, ligand or fusion protein or compositions in accordance with the disclosure is administered to the eye e.g. by topical administration, as eye drops, particulate polymer system, gel or implant, or by intraocular injection e.g. into the vitreous humour. Delivery can be targeted to particular regions of the eye such as the surface of the eye, or the tear ducts or lacrimal glands or to the anterior or posterior chambers of the eye such as the vitreous humour). It can also be useful if the immunoglobulin single variable domain, composition etc. is delivered to the eye along with an ocular penetration enhancer e.g. sodium caprate or with a viscosity enhancer e.g. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). In further embodiments, the polypeptide, fusion protein, single variable domain, antagonist or composition is administered to the skin; by topical delivery to the surface of the skin and/or delivery to a region(s) within the skin e.g. intradermal delivery.

Although the most accessible organ of the body for delivery, the skin's outermost barrier, the stratum corneum (SC), acts as a rate limiting barrier for drug delivery. Traditionally, intradermal injection has been required to circumvent the SC allowing delivery of drug to site of action in deeper skin layers. Delivery however, maybe achieved through other transdermal delivery approaches. Formulation methodologies maybe utilised for delivery, including: chemical enhancers to alter the lipid structure of the SC; peptide facilitators enabling transfollicular transport; and encapsidation in particles including, liposome's, niosomes, ethosomes and transfersomes, which are believed to aid local fluidisation of the lipids and formation of depots for prolonged effect. Iontophoresis, involving the application of a small electrical potential across the skin, has been used for localised drug delivery. Iontophoresis allows for both the delivery of charged and neutral molecules by electromigration and electroosmosis respectively. Microneedles, can be employed to create micron-sized channels in the skin to overcome the SC, allowing proteins to pass through these channels to the lower epidermis. Microneedles can be broadly classified into solid and hollow microneedles. Solid microneedles, maybe used to disrupt the SC, prior to drug administration, coated to allow delivery as drug dissolves from the needles, or soluble allowing drug release as the needles dissolve in situ. Hollow microneedles allow for infusion of a liquid formulation of drug substance. Electroporation, unlike iontophoresis requires higher voltages >50V, to alter skin permeability in order to enhance drug penetration. Thermal and radiofrequency ablation methodologies allow for disruption of the SC through localised heating and ablation of the SC. In heat ablation this results following application of high temperature for short periods of time, whereas radiofrequency ablation involves use of radiofrequencies, to vibrate microelectrodes on the skin, resulting in localised heating. Disruption of

the SC can also be achieved through Laser abrasion, application of low frequency ultrasound waves (sonophoresis) and jet injectors utilising high velocities to propel drug through the SC.

Moreover, the present disclosure provides a method for the treatment of disease using a polypeptide, single variable domain, composition, ligand or antagonist according to the present disclosure. In one embodiment the disease is a tissue fibrosis such as keloid disease or Dupuytren's Contracture.

In an aspect of the disclosure, the polypeptide, single variable domain, ligand, composition or antagonist is provided for therapy and/or prophylaxis of a disease or condition associated with TGFbeta signaling in a human. In another aspect, there is provided the use of the polypeptide, single variable domain, composition or antagonist, in the manufacture of a medicament for therapy or prophylaxis of a disease or condition associated with TGFbeta signaling in a human. In another aspect, there is provided a method of treating and/or preventing a disease or condition associated with TGFbeta signaling in a human patient, the method comprising administering the polypeptide, single variable domain, composition or antagonist to the patient. The disclosure also relates to therapeutic methods that comprise administering a therapeutically effective amount of a ligand of the disclosure (e.g., antagonist, or single variable domain) to a subject in need thereof.

In other embodiments, the disclosure relates to a method for treating idiopathic pulmonary fibrosis comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a ligand of the disclosure (e.g., antagonist, or single variable domain).

The disclosure also relates to a drug delivery device comprising the composition (e.g., pharmaceutical composition) of the disclosure. In some embodiments, the drug delivery device comprises a plurality of therapeutically effective doses of ligand.

In other embodiments, the drug delivery device is selected from the group consisting of parenteral delivery device, intravenous delivery device, intramuscular delivery device, intraperitoneal delivery device, transdermal or intradermal delivery device, pulmonary delivery device, intraarterial delivery device, intrathecal delivery device, intraarticular delivery device, subcutaneous delivery device, intranasal delivery device, ocular delivery device, vaginal delivery device, rectal delivery device, syringe, a transdermal delivery device, an intradermal delivery device, a capsule, a tablet, a nebulizer, an inhaler, an atomizer, an aerosolizer, a mister, a dry powder inhaler, a metered dose inhaler, a metered dose sprayer, a metered dose mister, a metered dose atomizer, and a catheter. In an embodiment the drug delivery device is a transdermal or intradermal delivery device.

Suitably, the disclosure provides a pulmonary delivery device containing a polypeptide, single variable domain, composition or antagonist according to the disclosure. The device can be an inhaler or an intranasal administration device. Suitably, the pulmonary delivery device enables delivery of a therapeutically effective dose of a ligand etc. in accordance with the disclosure.

In another embodiment, the disclosure provides an ocular delivery device containing a polypeptide, single variable domain, composition or antagonist according to the disclosure. Suitably,

the ocular delivery device enables delivery of a therapeutically effective dose of a ligand etc. in accordance with the disclosure.

As used herein, the term "dose" refers to the quantity of ligand administered to a subject all at one time (unit dose), or in two or more administrations over a defined time interval. For example, dose can refer to the quantity of ligand (e.g., ligand comprising an immunoglobulin single variable domain that binds TGFbetaRII) administered to a subject over the course of one day (24 hours) (daily dose), two days, one week, two weeks, three weeks or one or more months (e.g., by a single administration, or by two or more administrations). The interval between doses can be any desired amount of time. In a particular embodiment, the single variable domain or polypeptide of the invention is administered into the skin by injection, in particular by intradermal delivery, weekly or fortnightly or every 7-10 days, for example every 7, 8, 9 or 10 days.

In one embodiment, the single variable domain of the disclosure is provided as a dAb monomer, optionally unformatted (e.g., not PEGylated or half-life extended) or linked to a PEG, optionally as a dry powder formulation, optionally for delivery to a patient by inhalation (e.g., pulmonary delivery), optionally for treating and/or preventing a lung condition (e.g., Idiopathic pulmonary fibrosis).

The ligands of the disclosure provide several advantages. For example, as described herein, the ligand can be tailored to have a desired *in vivo* serum half-life. Domain antibodies are much smaller than conventional antibodies, and can be administered to achieve better tissue penetration than conventional antibodies. Thus, dAbs and ligands that comprise a dAb provide advantages over conventional antibodies when administered to treat disease, such as TGFbeta-signaling-mediated disease. In particular, pulmonary delivery of a dAb of the present disclosure to treat idiopathic pulmonary fibrosis enables specific local delivery of an inhibitor of TGFbeta signaling. Advantageously, an unformatted dAb monomer which specifically binds to and inhibits TGFbetaRII is small enough to be absorbed into the lung through pulmonary delivery.

The examples of WO2007085815 are incorporated herein by reference to provide details of relevant assays, formatting and experiments that can be equally applied to ligands of the present disclosure.

All publications, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference as though fully set forth.

The disclosure is further described, for the purposes of illustration only, in the following examples.

EXAMPLES

Example 1. Selection of dAbs which bind TGFbetaRII

Selection of dAbs which bind mouse TGFbetaRII

Naïve Selections: 4G and 6G naïve phage libraries, phage libraries displaying antibody single variable domains expressed from the GAS1 leader sequence (see WO2005093074) for 4G and additionally with heat/cool preselection for 6G (see WO04101790), were used. The DOM23 leads were isolated by panning pools of VH and VK libraries (identified as 4G H11-19 and 6G VH2-4 (VH dAbs) and 4G κ 1, 4G κ 2 and 6G κ (Vk dAbs) against the recombinant mouse and human TGF- β RII/Fc chimera protein. These chimeric proteins were made by expression of a DNA sequence encoding the amino acids residues 24 to 159 of the extracellular domain of human TGF- β Receptor Type II (Lin, *et al.*, 1992, *Cell* 68:775-785) fused to the Fc region of human IgG1 in a human embryonic kidney cell line, HEK-F.

The recombinant mouse and human TGF- β RII/Fc chimera proteins were biotinylated using EZ-LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotin reagent (Pierce, Rockford, USA) (Henderikx, *et al.*, 2002, Selection of antibodies against biotinylated antigens. Antibody Phage Display: Methods and protocols, Ed. O'Brien and Atkin, Humana Press). The phage libraries were pooled into six groups; 4G κ 1 and κ 2, 6G κ , 4G H11-13, 4G H14-16, 4G H17-19 and 6G VH2-4. 1×10^{11} phage per library were pooled.

The phage were blocked in 2 % MARVEL™ milk powder in phosphate buffered saline (MPBS) with the addition of 10 μ M Human IgG Fc fragment (Native IgG Fc fragment derived from human myeloma plasma IgG, Calbiochem, California, US, cat. no. 401104) for one hour. 200 nM biotinylated mouse TGF- β RII/Fc was incubated with the blocked phage and Fc fragment mixture for 1 hour at room temperature and then captured on streptavidin DYNAbeads™ (Dyna, UK) for five minutes. The beads were washed seven times with 1 ml phosphate buffered saline/0.1% TWEEN™ (PBST), followed by a wash with 1 ml phosphate buffered saline (PBS). The biotinylated mouse TGF- β RII/Fc -bound phage were eluted in 500 μ l 1mg/ml trypsin in PBS for 10 minutes and then used to infect 1.75 ml of log-phase *Escherichia coli* TG1 for 30 minutes. Cells were plated on 2 x TYE (Trypton Yeast Extract) agar plates supplemented with 15 μ g/ml tetracycline. For subsequent rounds of selections, cells were scraped from the plates and used to inoculate 50 ml 2 x TY (Trypton Yeast) + 15 μ g/ml tetracycline cultures that were grown overnight at 37°C for phage amplification.

Amplified phage was recovered by centrifugation of the overnight culture for 10 minutes at 4566 g. 40 ml of supernatant containing the amplified phage was added to 10ml of PEG/NaCl (20% v/w PEG 8000 + 2.5M NaCl) and incubated on ice for 45 to 60 minutes. The samples were centrifuged for 30 minutes at 4566 g to pellet the precipitated phage. The supernatant was discarded and the phage pellet was resuspended in 2ml 15% v/v glycerol/PBS. The phage sample was transferred to 2 ml Eppendorf tubes and centrifuged for 10 minutes at g to remove any remaining bacterial cell debris. The phage was used as input phage for the second round of selection. The second round of selection was performed as described for the first round, except approximately 1×10^{10} phage were added, and either 200 nM human TGF- β RII/Fc or 20 nM mouse TGF- β RII/Fc was used in the selections.

Second round outputs were cloned from the fd-phage vector, pDOM4 into pDOM10. Vector pDOM4, is a derivative of the fd phage vector in which the *gene III* signal peptide sequence is replaced with the yeast glycolipid anchored surface protein (GAS) signal peptide. It also contains a *c-myc* tag between the leader sequence and *gene III*, which puts the *gene III* back in frame. This leader sequence functions well both in phage display vectors but also in other prokaryotic expression vectors and can be universally used. pDOM10 is a plasmid vector designed for soluble expression of dAbs. It is based on pUC119 vector, with expression under the control of the *LacZ* promoter. Expression of dAbs into the supernatant was ensured by fusion of the dAb gene to the universal GAS leader signal peptide (see WO2005093074) at the N-terminal end. In addition, a FLAG-tag was appended at the C-terminal end of the dAbs.

Subcloning of the dAb genes was performed by isolating pDOM4 DNA from the cells infected by the selected dAb-displaying fd-phage using a QIAPREP™ Spin MINIPREP™ kit in accordance with the manufacturer's instructions (cat. no. 27104, Qiagen). The DNA was amplified by PCR using biotinylated oligonucleotides DOM57 (5' TTGCAGGCGTGGCAACAGCG-3' (SEQ ID NO:197) and DOM6 (5'-CACGACGTTGTAAAACGACGGCC-3' (SEQ ID NO:198)), digested with SalI and NotI restriction endonucleases and ligated with pDOM10 digested with SalI and NotI. The ligation products were transformed by electroporation into *E. coli* HB2151 cells and plated on TYE plates (Trypton Yeast Extract) supplemented with 100 µg/ml of carbenicillin (TYE-carb). Individual clones were picked and expressed in overnight express auto-induction medium (high-level protein expression system, Novagen), supplemented with 100 µg/ml carbenicillin. in 96-well plates, grown with shaking at either 30°C or 37°C. These expression plates were then centrifuged at 1800g for 10 minutes. dAb clones that bound mouse and/or human TGF-β RII/Fc were identified by an ELISA and BIACORE™ (GE HEALTHCARE™) screen or by MSD (Meso Scale Discovery) binding assay screen. For the ELISA, 96-well Maxisorp™ immuno plates (Nunc, Denmark) were coated with either human or mouse TGF-β RII/Fc overnight at 4°C. The wells were washed three times with PBST and then blocked with 1% TWEEN™ in PBS (1%TPBS) for 1 hour at room temperature. The block was removed and a 1:1 mixture of 1%TPBS and dAb supernatant was added for 1 hour at room temperature. The plate was washed three times with PBST and the detection antibody (Monoclonal anti-FLAG M2-peroxidase antibody, Sigma-Aldrich, UK) was added and incubated for 1 hour at room temperature. The plates were developed using a colourimetric substrate (SUREBLUE™ 1-component TMB Microwell Peroxidase solution, KPL, Maryland, USA) and the optical density (OD) measured at 450 nm, the OD₄₅₀ being proportional to the amount of bound detection antibody. For BIACORE™, supernatants were diluted 1:1 in HBS-EP buffer and screened on BIACORE™ for binding to biotinylated human and mouse TGF-β RII/Fc (SA chip coated with 1500 Ru biotinylated hRII-Fc and 1550 Ru biotinylated mRII-Fc in accordance with the manufacturer's recommendations) (BIACORE™, GE HEALTHCARE™). Samples were run on BIACORE™ at a flow rate of 50 µl / min.

Naïve human selections and screening

Selection of dAbs which bind human TGFβRII

Naïve selections were performed as described for mouse TGFβRII but using 150 and 15 nM biotinylated human TGFβRII/Fc at round one and two, respectively. A third round was performed using the same method as for round two, but with 1.5 nM biotinylated human TGFβRII/Fc.

The third round outputs were cloned from the fd-phage vector, pDOM4 into pDOM10. Subcloning of the dAb genes was performed by isolating pDOM4 DNA from the cells infected by the selected dAb-displaying fd-phage using a QIAPREP™ Spin MIDIPREP™ kit in accordance with the manufacturer's instructions (cat. no. 27104, Qiagen). The plasmid DNA was digested with SalI and NotI restriction endonucleases and the dAb gene insert ligated with pDOM10 digested with SalI, NotI and PstI restriction endonucleases. The ligation products were transformed by electroporation into E. coli HB2151 cells and plated on TYE plates (Trypton Yeast Extract) supplemented with 100 µg/ml of carbenicillin (TYE-carb). Individual clones were picked and expressed in 96-well plates at 250 rpm, 30°C 72 hours, in 1 ml/well overnight express auto-induction medium (Novagen) supplemented with 100 µg/ml carbenicillin. These plates were then centrifuged at 1800g for 10 minutes. The soluble dAb supernatants were screened for antigen binding in the TGFβRII MSD binding assay combined with the fluorescent polarization concentration determination assay. The number of human TGFβRII binders was high and there were too many clones to take forward for further characterization. Therefore, a subset of clones was sequenced and those with unique sequences were further characterized.

TGFβRII MSD binding assay

This assay was used to determine the binding activity of anti-TGFβRII dAbs. TGFβRII-Fc antigen was coated onto a MSD plate, which was subsequently blocked to prevent non-specific binding. Serially diluted supernatants containing soluble FLAG-tagged dAb were added. After incubation, the plate was washed and only dAbs that bound specifically to TGFβRII-Fc remained bound to the plate. Bound dAbs were detected with a ruthenylated anti-FLAG tagged antibody and MSD read buffer. If the concentration of the dAbs in the supernatant dilutions was determined using the Fluorescent Polarisation Concentration Determination assay, then concentration binding curves were plotted.

0.5 µl per well of either 60 µg/ml human TGFβRII-Fc, 60 µg/ml mouse TGFβRII-Fc or 60 µg/ml human IgG1 Fc (R&D systems, catalogue number 110-HG) was spotted onto 384 well MSD high bind plates (Meso Scale Discovery). The plates were air-dried at room temperature for a minimum of four hours and no longer than overnight. The plates were blocked with 50 µl per well of 5% MARVEL™ in Tris buffered saline (TBS) + 0.1 % TWEEN™ 20 for either 1 hour at room temperature or overnight at 4°C. The blocking reagent was removed from the wells by flicking the plates. A 1:3 dilution series of the the dAb supernatants was prepared in 2xTY medium. The dAbs

were expressed in the pDOM10 expression vector so were the dAb protein was expressed as a FLAG fusion protein. The blocking reagent was removed and 10 ul per well of the diluted dAb supernatants were transferred to the blocked MSD plates. The dAbs supernatants were screened as either 4 point curves or as 11 point curves. In addition to the diluted dAb supernatants, two controls were included in each plate, one low control (normalised to 0% binding), with no TGFbRII binding specificity and a high control (normalised to 100% binding) with high TGFbRII binding specificity, data not shown.

The plates were incubated with the dAb supernatants and the control samples for one hour at room temperature and then washed three times with 50 ul per well of TBS + 0.1% TWEEN™. 15 ul/well of ruthenylated anti-FLAG antibody was added to the plates and incubated for one hour at room temperature. The anti-FLAG antibody (anti-FLAG M2 monoclonal antibody, Sigma, UK, catalogue number F3165) was conjugated to ruthenium II tris-bipyridine N-hydroxy succinimide following the manufacturer's instructions (Meso Scale Discovery, catalogue number R91BN-1). The ruthenylated anti-FLAG antibody was added to all wells except to the mouse anti-human IgG1 Fc antibody control wells. Instead, 15 ul /well of anti-Mouse MSD tag (Meso Scale Discovery, catalogue number R31AC-1) were added. The anti-Mouse MSD tag was diluted in 2% MARVEL™ in TBS + 0.1% TWEEN™ 20 to a final concentration of 750 ng/ml. The plates were incubated at room temperature for one hour and washed three times with 50 ul per well of TBS + 0.1% TWEEN™. 35 ul 1x MSD read buffer (Meso Scale Discovery) was added to each well and the plates were read on a MSD Sector 6000 reader (Meso Scale Discovery).

Data were analysed using XC50 Activity Base. All data was normalised to the mean of the high and low control wells on each plate, with the low control normalised to 0% binding and the high control normalised to 100% binding. A four parameter curve fit was applied to the normalised data and concentration binding curves using dAb concentrations calculated using the Fluorescent Polarisation Concentration Determination of dAbs in supernatants assay, were plotted.

The four parameter fit used was as follows:

$$y = \frac{(a-d)}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d, \text{ where } a \text{ is the minimum, } b \text{ is the Hill slope, } c \text{ is the } XC50 \text{ and } d \text{ is the maximum.}$$

Fluorescence Polarisation Concentration Determination of dAbs in Supernatants Assay

This assay allows the concentration of soluble FLAG-tagged dAbs expressed in supernatants to be determined. A fluorescently labelled-FLAG peptide was mixed with an anti-FLAG antibody. The fluorescent molecules were excited with polarised light at a wavelength of 531 nM and the emitted polarised light was read at a wavelength of 595 nM. The addition of a FLAG-tagged dAb resulted in the displacement of the fluorescent peptide from the anti-FLAG antibody which in turn resulted in reduced polarisation of the emission signal. A standard curve of known concentrations of purified

FLAG-tagged VH dummy dAb was prepared and was used to back calculate the concentration of the soluble dAbs in the supernatants. The concentration data was combined with binding activity data, allowing concentration binding curves to be plotted for dAb supernatants.

The dAb supernatants were serially diluted 1:2 in 2xTY medium (1:2, 1:4, 1:8 and 1:16), followed by a 1:10 dilution in phosphate buffered saline (PBS). The diluted supernatants were transferred to a black 384 well plate. A standard curve was set up by serially diluting purified VH Dummy dAb 1:1.7 in 10% v/v 2xTY medium in PBS. The highest dAb concentration was 10 μ M and there were 16 dilutions in total. 5 μ l of each dilution was transferred to the 384 well plate. A mixture of 5 nM FLAG peptide labelled at the c-terminus with Cy3b, 100 mM anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma, catalogue number F3165), 0.4 mg/ml bovine serum albumin (BSA) in 2 mM CHAPs buffer was prepared. 5 μ l of the mixture was transferred to the wells containing the diluted dAbs (both supernatants and standard curve wells). The plate was centrifuged at 1000 rpm (216 g) for 1 minute and then incubated in the dark at room temperature for 15 minutes. The plates were read on an ENVISION™ reader (Perkin Elmer) fitted with the following filters;

Excitation filter: BODIPY TMR FP 531

Emission filter 1: BODIPY TMR FP P pol 595

Emission filter 2: BODIPY TMR FP P pol 595

Mirror: BODIPY TMR FP Dual Enh

The standard curve was plotted and used to back calculate the concentrations of the soluble dAbs in the supernatants.

Mouse and human TGF- β RII/Fc-binding dAbs identified in the ELISA, BIACORE™ and MSD binding assays were expressed in overnight express autoinduction medium (ONEX™, Novagen) at either 30°C for 48 to 72 hours. The cultures were centrifuged (4,600 rpm for 30 minutes) and the supernatants were incubated with STREAMLINE™-protein A beads (Amersham Biosciences, GE HEALTHCARE™, UK. Binding capacity: 5 mg of dAb per ml of beads), either overnight at 4°C or at room temperature for at least one hour. The beads were packed into a chromatography column and washed with either 1x or 2xPBS, followed by 10 or 100 mM Tris-HCl pH 7.4 (Sigma, UK). Bound dAbs were eluted with 0.1 M glycine-HCl pH 2.0 and neutralized with 1M Tris pH 8.0. The OD at 280 nm of the dAbs was measured and protein concentrations were determined using extinction coefficients calculated from the amino acid compositions of the dAbs.

The amino acid and nucleic acid sequences of the anti-human and anti-murine TGFRII dAb naive leads are given below.

Dom23h 802 amino acid sequence (SEQ ID NO:1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEGTMWWVRQAPGKGLEWVSAILAAGSNTYYADSVKGRFTISRDN
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKKRQERDGFQDYWGQGLTVTVSS

Dom23h 802 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:39)

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTAGTGAGGGGACGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGCTATTTTGGCTGCTGGTTCTAATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAAAAGAGGCAGGAGCGGGATGGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
10

Dom23h 803 amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAGRMWWVRQAPGKGLEWVSAINRDGTRTYADSVKGRFTISRDN
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHDDGHGNFDYWGQGLTVTVSS

15 Dom23h 803 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:40)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTAGTGCTGGGCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGCGATTAATCGGGATGGTACTAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
20 GTGCGAAACATGATGATGGTCATGGTAATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-813 amino acid sequence (SEQ ID NO:3)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTDDRMWWVRQAPGKGLEWVSAIQPDGHTTYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEQDVKGSSSFQDYWGQGLTVTVSS

25

DOM23h-813 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:41)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGATGATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGCTATTACGCCTGATGGTCATACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
30 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGGAACAGGATGTTAAGGGGTCGTCTTCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGC

DOM23h-815 amino acid sequence (SEQ ID NO:4)

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAEDRMWWVRQAPGKGLEWVSAIDPQGQHTYYADSVKGRFTISRDN
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQSTGSATSDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-815 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:42)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGCGGAGGATCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
5 TCTCAGCTATTGATCCTCAGGGTCAGCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGTCTACTGGGTCTGCTACGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-828 amino acid sequence (SEQ ID NO:5)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMYSYRMWWVRQAPGKGLEWVSAISPSGSDTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQVVEYSRTHKGVFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-828 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:43)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
15 CTCCGGATTACCTTTATGAGTTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGCTATTTCTCCGAGTGGTAGTGATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGGTGGTGGAGTATTCGCGTACTCATAAGGGTGTGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

20

DOM23h-830 amino acid sequence (SEQ ID NO:6)

EVQLLESGGGLVQPGGFLRLSCAASGFTFEGYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIDSLGDRITYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGLTHQSPSTFDYWGQGLTVTVSS

25 DOM23h-830 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:44)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTTCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGAGGGGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGCTATTGATTCTCTGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
30 GTGCGAAACAGGGGCTTACGCATCAGTCTCCGAGTACTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCGAGC

DOM23h-831 amino acid sequence (SEQ ID NO:7)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYKMTWVRQAPGKGLEWVSYITPSGGQTYADSVKGRFTISRDN
35 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYGSSFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-831 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:45)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGAGGCGTATAAGATGACGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGG
TCTCATATATTACGCCGTCTGGTGGTCAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
5 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAATATGGTTCGAGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-840 amino acid sequence (SEQ ID NO:8)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGDGRMWWVRQAPGKGLEWWSAIEGAGSDTYADSVKGRFTISRD
10 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQASRNSPFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-840 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:46)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGGGGATGGTCGTATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
15 TCTCAGCTATTGAGGGGGCGGGTTCGGATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGGCGTCGCGGAATTCGCCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-842 amino acid sequence (SEQ ID NO:9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDSEMAWARQAPGKGLEWWSLIRRNGNATYYADSVKGRFTISRD
20 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK/TKDRSVLFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-842 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:47)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
25 CTCCGGATTACCTTTGATGATAGTGAGATGGCGTGGGCCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCACTTATTCGGCGTAATGGTAATGCTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAAGTTACGAAGGATCGTTCTGTGCTTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA
GC

30

DOM23h-843 amino acid sequence (SEQ ID NO:10)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDQDRMWWVRQAPGKGLEWWSAIESGGHRTYYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQNESGRSGFDYWGQGLTVTVSS

35 DOM23h-843 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:48)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGATCAGGATCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGCTATTGAGAGTGGTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
5 GTGCGAAACAGAATGAGTCGGGGCGTTCGGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGC

DOM23h-850 amino acid sequence (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDAARMWWARQAPGKGLEWWSAIADIGNTTYADSVKGRFTISRD
10 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQSGSEDFDYWGQGLVTVSS

DOM23h-850 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:49)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGATGCGGCTAGGATGTGGTGGGCCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
15 TCTCAGCGATTGCGGATATTGTAATACTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGTCTGGTTCGGAGGATCATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-854 amino acid sequence (SEQ ID NO:12)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAQDRMWWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRD
20 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQDLHGTSSLFQDYWGQGLVTVSS

DOM23h-854 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:50)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
25 CTCCGGATTACCTTTGCTCAGGATCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGGATTTGCATGGTACTAGTTCTTTGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT
CGAGC

30

DOM23h-855 amino acid sequence (SEQ ID NO:13)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFENTSMGWVRQAPGKGLEWWSRIDPKGSHTYYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRELKSHFDYWGQGLVTVSS

35 DOM23h-855 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:51)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGAGAATACGAGTATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCACGTATTGATCCTAAGGGTAGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
5 GTGCGAAACAGCGTGAGTTGGGTAAGTCGCATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGC

DOM23h-865 amino acid sequence (SEQ ID NO:14)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYEMTWVRQAPGKGLEWVSKIDPSGRFTYYADSVKGRFTISRDN
10 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRDLDLQFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-865 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:52)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTCTAGTTATGAGATGACTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGT
15 CTCAAAGATTGATCCTTCGGGTCGTTTTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG
CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTG
TGCGAAAGGTCGGACGGATCTTCAGCTTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-866 amino acid sequence (SEQ ID NO:15)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMRWARQAPGKGLEWVSYITPKGDHTYYADSVKGRFTISRD
20 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAESLHNERVKHFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-866 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:53)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
25 CTCCGGATTACCTTTTCGAATTATTGGATGCGGTGGGCCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCATATATTACTCCTAAGGGTGATCATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG
CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTG
TGCGGAATCGCTTCATAATGAGCGTGTTAAGCATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC
GAGC

30

DOM23h-874 amino acid sequence (SEQ ID NO:16)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYRMWWVRQAPGKGLEWVSVIDSTGSATYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAGSAMGEFDYWGQGLTVTVSS

35 DOM23h-874 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:54)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTACTAGTTATCGTATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGT
CTCAGTTATTGATTCTACTGGTTCGGCTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG
CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTG
5 TGCGAAACAGCAGGCTGGGAGTGCGATGGGGGAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT
CGAGC

DOM23h-883 amino acid sequence (SEQ ID NO:17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVNYRMWWVRQAPGKGLEWVSAISGSGDKTYADSVKGRFTISR
10 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGLSFDYWGQGLVTVSS

DOM23h-883 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:55)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGTTAATTATCGTATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGT
15 CTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGATAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG
CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTG
TGCGAAACATGGGCTGTCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-903 amino acid sequence (SEQ ID NO:18)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDMRMWWVRQAPGKGLEWVSVINADGNRTYYADSVKGRFTISR
20 DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGLPFDYWGQGLVTVSS

DOM23h-903 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:56)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
25 CTCCGGATTACCTTTAATGATATGAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGTGATTAATGCTGATGGTAATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAAGATGGGCTGCCTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30 DOM23m-4 amino acid sequence (SEQ ID NO:19)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYGMGWVRQAPGKGLEWVSWIEKTGNKTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGRIKVRSRDFDYWGQGLVTVSS

DOM23m-4 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:57)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
35 CTCCGGATTACCTTTACGACTTATGGTATGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG

TCTCATGGATTGAGAAGACGGGTAATAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAAGCGGGGAGGCATATTAAGGTGCGTTCGAGGGATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTC
ACCGTCTCGAGC

5

DOM23m-29 amino acid sequence (SEQ ID NO:20)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKRYSMGWVRQAPGKGLEWVSVINDLGSLTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNISMVRPGSWFDYWGQGLTVTVSS

10 DOM23m-29 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:58)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTAAGAGGTATTCTATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAGTTATTAATGATCTGGGTAGTTTGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
15 GTGCGAAAGGGAATATTAGTATGGTGAGGCCGGGGAGTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTC
ACCGTCTCGAGC

DOM23m-32 amino acid sequence (SEQ ID NO:21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFEYPMGWVRQAPGKGLEWVSVISGDGQRTYYADSVKGRFTISR
20 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSHGTVRHLETFDYWGQGLTVTVSS

DOM23m-32 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:59)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTTTTGTAGTATCCTATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGT
25 CTCAGTTATTAGTGGGGATGGTCAGCGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG
CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTG
TGCGAAAAGTCATACGGGGACTGTGAGGCATCTGGAGACGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCA
CCGTCTCGAGC

30 DOM23m-62 amino acid sequence (SEQ ID NO:22)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQESMYWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGTRIKQGFYWGQGLTVTVSS

DOM23m-62 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:60)

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTGGTCAGGAGAGTATGTATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG

TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAAAGTGGTACGCGGATTAAGCAGGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCG
AGC

5

DOM23m-71 amino acid sequence (SEQ ID NO:23)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMDYRMYWVRQAPGKGLEWVSGIDPTGLRITYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIKWGEMGSYKTFDYWGQGLTVTVSS

10 DOM23m-71 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:61)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTATGGATTATAGGATGTATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGT
CTCAGGGATTGATCCTACTGGTTTGCGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG
CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTG
15 TGCGAAAATTAAGTGGGGGGAGATGGGGAGTTATAAGACTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCA
CCGTCTCGAGC

DOM23m-72 amino acid sequence (SEQ ID NO:24)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMDYDMSWVRQAPGKGLEWVSMIREDGGKTYADSVKGRFTISR
20 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARVPYRRGHRDNFDYWGQGLTVTVSS

DOM23m-72 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:62)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTATGGATTATGATATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGT
25 CTCAATGATTCGTGAGGATGGTGGTAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG
CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTG
TGCGAAAGCGAGGGTGCCTTATCGGCGTGGGCATAGGGATAATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGG
TCACCGTCTCGAGC

30 DOM23m-81 amino acid sequence (SEQ ID NO:25)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEPVIMGWVRQAPGKGLEWVSAIEARGGGTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPGRHLSQDFDYWGQGLTVTVSS

DOM23m-81 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:63)

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
TTCCGATTACCTTTGAGCCGTTATTATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG

TCTCAGCTATTGAGGCGCGGGGTGGGGGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCC
CGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTAC
TGTGCGAAACCTGGGCGGCATCTTAGTCAGGATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGC

5

DOM23m-99 amino acid sequence (SEQ ID NO:26)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTRYRMMWVRQAPGKGLEWVSTIDPAGMLTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRLASRSHFDYWGQGLTVTVSS

10 DOM23m-99 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:64)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTGATCGGTATCGTATGATGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGG
TCTCAACGATTGATCCTGCTGGTATGCTTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
15 GTGCGAAAAGGCTGGCTTCGCGGAGTCATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23m-101 amino acid sequence (SEQ ID NO:27)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYDMAWVRQAPGKGLEWVSRIRSDGVRTYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRAKNGWFDYWGQGLTVTVSS

20

DOM23m-101 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:65)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGCGCAGC
CTCCGATTACCTTTTTCTGAGTATGATATGGCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTTGAGTGGGT
CTCACGGATTCTTCTGATGGTGTTAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG
25 CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTG
TGCGAAAGATCGTGCTAAGAATGGTTGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-352 amino acid sequence (SEQ ID NO:28)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYKMAWVRQAPGKGLEWVSLIFPNGVPTYANYSVKGRFTISRDN
30 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYSQGQGRDFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-352 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:66)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTTGATAAGTATAAGATGGCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGG
35 TCTCACTTATTTTTCCGAATGGTGTTCCTACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG

CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTG
TGCGAAATATAGTGGTCAGGGGCGGGATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

5 The CDRs as defined by Kabat of these anti-human and anti-murine TGFRII dAb naive leads are shown in Tables 1 and 2, below, respectively.

Table 1. CDR Sequences of anti-human TGF β RII dAbs

Clone	CDR1	CDR2	CDR3
DOM23h-802	SEGTMW (SEQ ID NO:77)	AILAAGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:113)	KRQERDGFY (SEQ ID NO:149)
DOM23h-803	SAGRMW (SEQ ID NO:78)	AINRDGTRTYADSVKG (SEQ ID NO:114)	HDDGHGNFDY (SEQ ID NO:150)
DOM23h-813	TDDRMW (SEQ ID NO:79)	AIQPDGHTTYADSVKG (SEQ ID NO:115)	EQDVKGSSSFY (SEQ ID NO:151)
DOM23h-815	AEDRMW (SEQ ID NO:80)	AIDPQGQHTTYADSVKG (SEQ ID NO:116)	QSTGSATSDY (SEQ ID NO:152)
DOM23h-828	MSYRMW (SEQ ID NO:81)	AISPSGSDTYADSVKG (SEQ ID NO:117)	QVVEYSRTHKGVFDY (SEQ ID NO:153)
DOM23h-830	EGYRMW (SEQ ID NO:82)	AIDSLGDRTYADSVKG (SEQ ID NO:118)	QGLTHQSPSTFDY (SEQ ID NO:154)
DOM23h-831	EAYKMT (SEQ ID NO:83)	YITPSGGQTYADSVKG (SEQ ID NO:119)	YGSSFDY (SEQ ID NO:155)
DOM23h-840	GDGRMW (SEQ ID NO:84)	AIEGAGSDTYADSVKG (SEQ ID NO:120)	QASRNSPFDY (SEQ ID NO:156)
DOM23h-842	DDSEMA (SEQ ID NO:85)	LIRRNGNATYYADSVKG (SEQ ID NO:121)	VTKDRSVLFDY (SEQ ID NO:157)
DOM23h-843	DQDRMW (SEQ ID NO:86)	AIESGGHRTYYADSVKG (SEQ ID NO:122)	QNESGRSGFDY (SEQ ID NO:158)
DOM23h-850	DAARMW (SEQ ID NO:87)	AIADIGNTTYADSVKG (SEQ ID NO:123)	QSGSEDFY (SEQ ID NO:159)
DOM23h-854	AQDRMW (SEQ ID NO:88)	AISGSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:124)	QDLHGTSSLFDY (SEQ ID NO:160)

DOM23h-855	ENTSMG (SEQ ID NO:89)	RIDPKGSHTYYADSVKG (SEQ ID NO:125)	QRELKSHFDY (SEQ ID NO:161)
DOM23h-865	RSYEMT (SEQ ID NO:90)	KIDPSGRFTYYADSVKG (SEQ ID NO:126)	GRTDLQLFDY (SEQ ID NO:162)
DOM23h-866	SNYWMR (SEQ ID NO:91)	YITPKGDHTYYADSVKG (SEQ ID NO:127)	SLHNERVKHFDY (SEQ ID NO:163)
DOM23h-874	TSYRMW (SEQ ID NO:92)	VIDSTGSATYYADSVKG (SEQ ID NO:128)	QQAGSAMGEFDY (SEQ ID NO:164)
DOM23h-883	VNYRMW (SEQ ID NO:93)	AISGSGDKTYADSVKG (SEQ ID NO:129)	HGLSFDY (SEQ ID NO:165)
DOM23h-903	NDMRMW (SEQ ID NO:94)	VINADGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO:130)	DGLPFDY (SEQ ID NO:166)

Table 2. CDR Sequences of anti-murine TGF β RII dAbs

Clone	CDR1	CDR2	CDR3
DOM23m-4	TTYGMG (SEQ ID NO:95)	WIEKTGNKTYADSVKG (SEQ ID NO:131)	AGRHIKVRSRDFDY (SEQ ID NO:167)
DOM23m-29	KRYSMG (SEQ ID NO:96)	VINDLGSLTYADSVKG (SEQ ID NO:132)	GNISMVRPGSWFDY (SEQ ID NO:168)
DOM23m-32	FEYPMG (SEQ ID NO:97)	VISGDGQRTYYADSVKG (SEQ ID NO:133)	SHTGTVRHLETFDY (SEQ ID NO:169)
DOM23m-62	GQESMY (SEQ ID NO:98)	AISGSGGSTYYADSVKGR (SEQ ID NO:134)	SGTRIKQGFY (SEQ ID NO:170)
DOM23m-71	MDYRMW (SEQ ID NO:99)	GIDPTGLRTYYADSVKG (SEQ ID NO:135)	IKWGEMGSYKTFDY (SEQ ID NO:171)
DOM23m-72	MDYDMS (SEQ ID NO:100)	MIREDDGGKTYADSVKGR (SEQ ID NO:136)	ARVPYRRGHRDNFDY (SEQ ID NO:172)
DOM23m-81	EPVIMG (SEQ ID NO:101)	AIEARGGGTYADSVKG (SEQ ID NO:137)	PGRHLSQDFDY (SEQ ID NO:173)
DOM23m-99	DRYRMM (SEQ ID NO:102)	TIDPAGMLTYADSVKG (SEQ ID NO:138)	RLASRSHFDY (SEQ ID NO:174)
DOM23m-101	SEYDMA (SEQ ID NO:103)	RIRSDGVRTYYADSVKG (SEQ ID NO:139)	DRAKNGWFDY (SEQ ID NO:175)
DOM23h-352	DKYKMA (SEQ ID NO:104)	LIFPNGVPTYANSVKV (SEQ ID NO:140)	YSGQGRDFDY (SEQ ID NO:176)

Example 2. DSC (differential scanning calorimetry) – naive clones

dAbs thermal stability was determined using Differential Scanning Calorimetry (DSC). dAbs were dialysed overnight into PBS to a final concentration of 1mg/ml. The dialysis buffer was used as a reference for all samples. DSC measurements were performed using the GE HEALTHCARE™-MICROCAL™VP-DSC capillary cell microcalorimeter, at a heating rate of 180°C/hour. A typical scan range was from 20-90°C for both the reference buffer and the protein sample. A rescan was performed each time in order to assess the extent of protein refolding under these experimental conditions. After each protein sample scan, the capillary cell was cleaned with a solution of 5% DECON™ (Fisher-Scientific) in water followed by a PBS scan. Resulting data traces were analyzed using Origin 7.0 software. The DSC trace obtained from the reference buffer scan was subtracted from that of the protein sample scan. The precise molar concentration of the protein sample was entered into the data analysis routine to yield values for melting temperature (T_m), enthalpy (ΔH) and Van't Hoff enthalpy (ΔH_v) values. Data were fitted to a non-2-state model (N2M). The best fit was obtained with either 1 or 2 transition events. The T_m values obtained for the dAbs described in this patent range from 52.1°C to 73.3°C. T_m values and percentage of refolding are shown in Table 3.

Table 3

dAb Name	DSC Apparent Tm °C			% refolding
	1-transition N2M	2-transition N2M		
	Tm	Tm1	Tm2	
DOM23h-802	-	56.28	57.54	0
DOM23h-803	-	61.19	64.59	23
DOM23h-813	52.11	-	-	100
DOM23h-815	65.13	-	-	93
DOM23h-828	-	60.86	59.40	0
DOM23h-830	-	57.01	58.15	0
DOM23h-831	-	55.29	57.19	0
DOM23h-840	63.70	-	-	100
DOM23h-842	63.08	-	-	27
DOM23h-843	60.15	-	-	60
DOM23h-850	58.27	-	-	60
DOM23h-854	-	55.31	58.20	30
DOM23h-855	70.32	-	-	88
DOM23h-865	63.02	-	-	0
DOM23h-866	-	52.88	55.77	18

DOM23h-874	-	58.83	60.15	0
DOM23h-883	-	66.78	59.14	0
DOM23h-903	-	59.11	61.98	24
DOM23m-4	-	57.1	61.3	0
DOM23m-29	68	-	-	0
DOM23m-32	-	70.4	73.3	25
DOM23m-62	-	-	-	-
DOM23m-71	63	-	-	0
DOM23m-72	-	-	-	-
DOM23m-81	-	-	-	-
DOM23m-99	-	58.5	59	0
DOM23m-101	64	-	-	30
DOM23m-352	66	-	-	50

All molecules maintain tertiary structure up to at least 52°C upon heating.

Example 3. SEC-MALS (size exclusion chromatography with multi-angle-LASER-light scattering) – naive clones

To determine whether dAbs are monomeric or form higher order oligomers in solution, they were analyzed by SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle-LASER-Light-Scattering). Agilent 1100 series HPLC system with an autosampler and a UV detector (controlled by Empower software) was connected to Wyatt Mini Dawn Treos (Laser Light Scattering (LS) detector) and Wyatt Optilab rEX DRI (Differential Refractive Index (RI) detector). The detectors were connected in the following order -UV-LS-RI. Both RI and LS instruments operate at a wavelength of 658nm; the UV signal was monitored at 280nm and 220nm. Domain antibodies (100 microliters injection at a concentration of 1mg/mL in PBS) were separated according to their hydrodynamic properties by size exclusion chromatography using a GE HEALTHCARE™ 10/300 Superdex 75 column. The mobile phase was PBS plus 10% ethanol. The intensity of the scattered light while protein passed through the detector was measured as a function of angle. This measurement taken together with the protein concentration determined using the RI detector allowed calculation of the molar mass using appropriate equations (integral part of the analysis software Astra v.5.3.4.14). All the dAbs described herein have a monomeric content ranging from 65% to 98%. Data is shown in Table 4.

Table 4

dAb name	Monomer by SEC-MALLS (%)
DOM23h-802	92.5
DOM23h-803	96.4
DOM23h-813	96.6
DOM23h-815	98
DOM23h-828	80
DOM23h-830	65
DOM23h-831	72
DOM23h-840	91
DOM23h-842	91.6
DOM23h-843	90.2
DOM23h-850	97.7
DOM23h-854	83.4
DOM23h-855	96.3
DOM23h-865	83
DOM23h-866	92.4
DOM23h-874	92.6
DOM23h-883	93.5
DOM23h-903	96.5
DOM23m-4*	93
DOM23m-29*	95
DOM23m-32*	92
DOM23m-62	Not determined
DOM23m-71*	88
DOM23m-72	Not determined
DOM23m-81	Not determined
DOM23m-99	79
DOM23m-101	77.4
DOM23m-352	93

*These dAbs were run using the same SEC-MALLS set up as described above except that the HPLC used was a Shimadzu LC-20AD Prominence system. These dAbs were also run on a Superdex75 column but the mobile phase buffer was PBS.

The molecules listed in the tables 3 and 4 were chosen on the basis of Solution State (propensity for monomer) content and Thermal stability. All molecules show a $\geq 65\%$ propensity for monomerisation and maintain tertiary structure up to at least 52°C upon heating.

5

Example 4. Assays for TGFbetaRII inhibition (naive clones)

MC3T3-E1 luciferase assay – method m1:

The MC3T3-E1 luciferase assay measures the ability of dAbs to inhibit TGF β -induced expression of CAGA-luciferase in MC3T3-E1 cells. Three copies of a TGF β -responsive sequence motif, termed a CAGA box are present in the human PAI-1 promoter and specifically bind Smad3 and 4 proteins. Cloning multiple copies of the CAGA box into a luciferase reporter construct confers TGF β responsiveness to cells transfected with the reporter system. This assay uses MC3T3-E1 cells (mouse osteoblasts) stably transfected with a [CAGA]₁₂-luciferase reporter construct (Dennler, et al. (1998) EMBO J. 17, 3091–3100).

15 Soluble dAbs were tested for their ability to block TGF- β 1 signaling via the Smad3/4 pathway.

The protocol used to generate the data which appears as method m1 in table 5, is as follows. Briefly, 2.5×10^4 MC3T3-E1 cells per well in assay medium (RPMI medium (Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK), 10 % heat inactivated foetal calf serum, and 1 % penicillin/streptomycin) were added to a tissue culture 96 well plate (Nunc), followed by the dAb and TGF- β 1 (final concentration 1 ng/ml) and incubated for six hours at 37°C, 5% CO₂. dAbs were dialysed into PBS prior to being tested in the assay. BRIGHTGLOW™ luciferase reagent (Promega, UK) was added to the wells and incubated at room temperature for two minutes to allow the cells to lyse, and the resulting luminescence measured on a luminometer.

25 The assay was performed multiple times to obtain an average and range of maximum % inhibitions values which are summarised in Table 5. This method has been modified and is described below.

Modified MC3T3-E1 luciferase assay - method m2.

30 MC3T3-E1 cells were added to 96 well plates (Nunc 13610) at 1.25×10^4 per well in "plating medium" (MEM-Alpha + Ribonucleosides, + Deoxyribonucleosides (Invitrogen 22571), 5% Charcoal stripped FCS (Perbio Sciences UK Ltd; SH30068.03), 1/100 Sodium Pyruvate (Invitrogen11360), 250 μ g/ml of Geneticin 50mg/ml (Invitrogen, 10131027), and incubated overnight at 37°C, 5% CO₂. The media from the cells was replaced with "assay media" (DMEM (Invitrogen 31966021,) 25mM Hepes (Invitrogen)), and purified dAbs in PBS at 4x final assay concentration were titrated in "assay media" and added to the cell plates, followed by TGF- β 1 (R&D, 240B) at 4x the EC80. The plates were incubated for six hours at 37°C, 5% CO₂. STEADYLITE™ luciferase reagent (PerkinElmer

35

6016987) was added to the wells and incubated at room temperature for 30 minutes, and the resulting luminescence measured on a the ENVISION™ plate reader.

Each dAb was titrated in duplicate in an assay and a maximum % inhibition determined (n=2). The assay was performed multiple times to obtain an average and range of maximum % inhibitions values which are summarised in Table 5. The assay QC parameters were met; in-house small molecule showing an IC50 range from 100 to 900nM for the mouse assays. Also, the robust Z factors were greater than 0.4 and the TGF- β EC80 was within 6 fold of the concentration added to the assay.

A549 IL-11 release assay – h1

The A549 Interleukin-11 (IL-11) release assay measures the ability of dAbs to inhibit human TGF- β 1 stimulated IL-11 release from A549 cells. TGF- β 1 binds directly to TGF- β RII and induces the assembly of the TGF- β RI/II complex. TGF- β RI is phosphorylated and is able to signal through several pathways including the Smad4 pathway. Activation of the Smad4 pathway results in the release of IL-11. The IL-11 is secreted into the cell supernatant and is then measured by colourmetric ELISA.

Soluble dAbs were tested for their ability to block TGF- β 1 signalling via the Smad4 pathway. Briefly, 1x10⁵ A549 cells per well in "assay medium" (DMEM high glucose medium (Gibco™, Invitrogen Ltd, Paisley, UK), 10 % heat inactivated foetal calf serum (PAA, Austria), 10 mM HEPES (Sigma, UK) and 1 % penicillin/streptomycin (PAA, Austria)) were added to a tissue culture 96 well plate (Nunc), followed by the dAb and TGF- β 1 (final concentration 3 ng /ml) (R&D Systems, Abingdon, UK) and incubated overnight at 37°C, 5% CO₂. dAbs were dialysed into PBS prior to being assayed. The concentration of IL-11 released into the supernatant was measured using a Human IL-11 DUOSET™ (R&D systems, Abingdon, UK), in accordance with the manufacturer's instructions.

The A549 IL-11 release assay is referred to in tables 5 and 6 as assay method h1. The assay was performed multiple times to obtain an average and range of maximum % inhibitions values which are summarised in Table 5. The assay QC parameters were met; in-house small molecule showing an IC50 range from 50 to 500nM for the human assays.

SBE-bla HEK 293T Cell Sensor assay – h2:

Members of the Smad family of signal transduction molecules are components of an intracellular pathway that transmits TGF- β signals from the cell surface to nucleus. TGF- β 1 binds directly to TGF- β RII and induces the assembly of the TGF- β RI/II complex. Smad2 and Smad3 are then phosphorylated by TGF- β RI, and subsequently form a heteromeric complex with the co-smad family member Smad4. These complexes are translocated to the nucleus where they bind DNA and regulate gene transcription.

Cell Sensor SBE-bla HEK 293T cells contain a beta-lactamase reporter gene under control of the Smad binding element (SBE) which was stably integrated into HEK 293T cells (Invitrogen, UK). The cells are responsive to TGF- β I and can be used to detect agonists / antagonists of the Smad2/3 signaling pathway.

5 Soluble dAbs were tested for their ability to block TGF- β 1 signaling via this pathway following the method below, which was based on an optimised method from Invitrogen, UK, (cell line K1108).

The assay was performed direct from frozen cells which had been grown for at least 4 passages in growth media (DMEM high glucose, Invitrogen 21068028, 10% Dialysed U.S. FBS. 10 Invitrogen 26400-044, 0.1mM (1/100) Non essential amino acids. Invitrogen 11140-050, 25mM (1/40) HEPES buffer. Sigma H0887, 1mM (1/100) Sodium pyruvate. Invitrogen 11360-070, 1% GLUTAMAX™. (200mM Invitrogen 35050038), 5 μ g/ml of Blasticidin. Invitrogen R21001) and frozen in house (at 4x10⁷/ml). The cells were plated at 20,000 cells per well in cell culture plates (Costar 3712) in plating media (as above with 1% FCS and no blasticidin). After incubating the cells 15 overnight, the purified dAbs were diluted in "assay media" (DMEM (Invitrogen 31966021,) 25mM Hepes (Invitrogen) and added to the cells at 4x final assay concentration. After a 1 hour incubation at 37°C, TGF- β (R&D Systems; 240B) was added at 4x EC80 and incubated for a further 5 hours. The LIVEBLAZER™ substrate (Invitrogen K1030), was made up according to the manufacturer's instructions and added at 8x the volume. The plates were incubated in the dark at room 20 temperature for 16 hours and read on the ENVISION™ plate reader according to the Invitrogen protocol.

The SBE-bla HEK CELLSSENSOR™ assay is referred to in tables 5 and 6 as method h2. Each dAb was titrated in duplicate in an assay and an IC50 determined and maximum % inhibition determined (n=2). Due to the difficulty of obtaining full curves in the mouse assay, only % 25 inhibitions are quoted in table 5. The assay was performed multiple times to obtain an average and a range of values which are summarised in Tables 5 and 6. The arithmetic mean IC50 was calculated using pIC50's (-log of IC50), and the range calculated adding and subtracting the log standard deviation from mean pIC50, and then transforming back to IC50. The assay QC parameters were met; in-house small molecule showing an IC50 range from 50 to 500nM for the 30 human assays. Also, the robust Z factors were greater than 0.4 and the TGF- β EC80 was within 6 fold of the concentration added to the assay

The results are shown in Tables 5 and 6. .

Table 5. Cell Functional assay data for mouse specific clones plus VH Dummy dAb.

	Mouse 3T3 cell assay					Human IL-11 release (h1) or SBE-bla HEK CELLSSENSOR™ assay (h2)				
	Assay Method	max % inhibition				Assay Method	max % inhibition			
		Average	SD	range	n		Average	SD	range	n
DOM23m-04	m1	73.3	8.4	68.8 - 83	3	h1	70.7	6.4	67 - 78	3
DOM23m-04						h2	69.0			1
DOM23m-29	m1	54.2	5.2	50.5 - 57.9	2					
DOM23m-32	m1	39.7	4.0	36.9 - 42.5	2					
DOM23m-62	m1	78.6			1	h1	79.0			1
DOM23m-71	m1	44.9	9.3	38.3 - 51.4	2	h1	-2.0			1
DOM23m-72	m1	17.5	24.7	0 - 34.9	2	h1	1.7			1
DOM23m-81	m2	30.3	11.5	21 - 47	4					
DOM23m-99	m2	46.5	28.0	26.7 - 93.5	6					
DOM23m-101	m2	48.0	19	22.0 - 74.1	12	h2	59.8	27.0	17 - 81	5
DOM23h-352	m2	48.0	23.9	16.8 - 78.9	16	h2	46.7	36.5	5.7 - 86	5
VHDUM-2	m2	21.4	13.2	21 - 33.9	15	h2	46.0	29.6	17 - 84	6
VHDUM-2	m1	22.5	0	22.5	2					

Table 6. Cell Functional data for human specific clones plus VH Dummy dAb.

Assay method	dAb	IC50 nM			
		Mean		IC50 range (+/- log SD)	n
h2	DOM23h-802	>	11062	6592 - 18562	6
h2	DOM23h-803	>	11619	5890 - 22922	6
h2	DOM23h-813	>	9328	4301 - 20230	6
h2	DOM23h-815		7122	3026 - 16764	4
h2	DOM23h-828		9899.07	4441 - 22065	4
h2	DOM23h 830		6299	5442 - 7291	4
h2	DOM23h-831	>	3126	534 - 18291	8
h2	DOM23h 840		2915	650 - 13081	7
h2	DOM23h 842		2042	2223 - 18704	4
h2	DOM23h-843	>	9007	3396 - 23894	8
h2	DOM23h-850		5350	2358 - 12137	6
h2	DOM23h-854	>	9551	3085 - 29569	8
h2	DOM23h-855	>	4467	1088 - 18339	8
h2	DOM23h 865		5559	1070 - 28893	4
h2	DOM23h 866	>	1762	195 - 15900	6
h2	DOM23h 874	>	925	89 - 9591	6
h2	DOM23h 883		10123	60 - 17344	6

h2	DOM23h 903		1048	492 - 223	5
h2	VHDummy-2	>	25119	25000- 250000	12

The mouse clones were selected on the basis that they showed greater than 40% neutralisation of TGF- β in several assays. The only exception to this was DOM23m-72. The clones also showed good neutralisation curves (data not shown). The human clones were selected on the basis that the average IC₅₀'s were less than 15 μ M.

Example 5. Error Prone Affinity Maturation of Naive Clones (from Example 1)

Error-prone mutagenesis was performed to improve the affinity of the dAbs identified as active with suitable biophysical characteristics (described above).

- 10 Phage Library Construction: Error prone libraries of DOM23h-843, DOM23h-850, DOM23h-854, DOM23h-855, DOM23h-865, DOM23h-866, DOM23h-874, DOM23h-883, DOM23h-439 and DOM23h-903, were made using GENEMORPH™ II Random Mutagenesis kit (Stratagene, Cat No 200550). The target dAb genes were amplified by PCR using Taq DNA polymerase and oligonucleotides DOM008 (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3' (SEQ ID NO:185)) and DOM009 (5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' (SEQ ID NO:186)), followed by re-amplification of the diluted PCR product with oligonucleotides DOM172 (5' TTGCAGGCGTGGCAACAGCG-3' (SEQ ID NO:187)) and DOM173 (5'-CACGACGTTGTAAACGACGGCC-3' (SEQ ID NO:188)), and MUTAZYME™ II DNA polymerase, according to manufacturer's instructions. This PCR product was further amplified using Taq DNA polymerase and oligonucleotides DOM172 and DOM173, to increase the DNA product yield.
- 20 The PCR product was digested with Sal I and Not I restriction endonucleases. Undigested product and digested ends were removed from the digested product using streptavidin beads (DynaL Biotech, UK). For the anti-human error prone selections digested product was ligated into pDOM4 phage vector digested with Sal I and Not I restriction endonucleases and used to transform E. coli TB1 cells. The transformed cells were plated on 2xTY agar supplemented with 15 μ g/ml tetracycline, yielding library sizes of $>1 \times 10^7$ transformants.

- Human TGFbetaRII specific dAb Error-prone selections: Three rounds of selection were performed with the DOM23h-843, DOM23h-850, DOM23h-854, DOM23h-855, DOM23h-865, DOM23h-866, DOM23h-874, DOM23h-883, DOM23h-903, and DOM23h-439 libraries. Round one was performed using 1 nM biotinylated human TGFbetaRII/Fc (N13241-57). Two different methods were followed for rounds two and three, method 1 using the dimeric TGFbetaRII/Fc form of the antigen and method two using the soluble, monomeric form of TGFbetaRII. Method 1: Round two was performed with 1 nM biotinylated human TGFbetaRII/Fc with 1 μ M non-biotinylated human TGFbetaRII/Fc competitor. Round three was performed with 100 pM biotinylated human TGFbetaRII/Fc with 1 μ M non-biotinylated human TGFbetaRII/Fc (N12717-4). Method 2: Round two was performed with 1 nM biotinylated human TGFbetaRII with 1 μ M non-biotinylated human

TGFbetaRII competitor. Round three was performed with 100 pM biotinylated human TGFbetaRII with 1 uM non-biotinylated human TGFbetaRII competitor.

Second and third round selection outputs were subcloned into the pDOM13 vector, as described above. Individual clones were picked and expressed in 96 well plates at 850 rpm, 37°C for 24 hours, 90% humidity in 0.5 ml/well overnight express auto-induction medium supplemented with 100 μ g/ml carbenicillin. Plates were then centrifuged at 1800g for 10 minutes. Supernatants were diluted either 1/5 or 1/2 in HBS-EP buffer and screened on BIACORE™ for binding to biotinylated human TGF- β RII/Fc (SA chip coated with 1000 Ru biotinylated hRII-Fc in accordance with the manufacturer's recommendations) (BIACORE™, GE HEALTHCARE™). Samples were run on BIACORE™ at a flow rate of 50 μ l/min. Clones that bound with a high number of resonance units (RUs) or with an improved off-rate compared to the parent clone were expressed in 50ml overnight express autoinduction medium at 30°C for 48 to 72 hours and centrifuged at 4,600 rpm for 30 minutes. The supernatants were incubated overnight at 4°C with Streamline-protein A beads. The beads were then packed into drip columns, washed with 5 column volumes of 2xPBS, followed by one bed volume of 10 mM Tris-HCl pH 7.4 and bound dAbs were eluted in 0.1 M glycine-HCl, pH 2.0 and neutralised with 1 M Tris-HCl, pH 8.0. The OD at 280 nm of the dAbs was measured and protein concentrations were determined using extinction coefficients calculated from the amino acid compositions of the dAbs.

In vitro analysis of off rate improved error prone selections: Purified dAbs were subjected to the same tests as those from the naïve selections, namely, Biacore, SBE-bla HEK 293T Cell Sensor assay (h2), DSC, and SEC-MALS. Examples of clones improved over parent are shown in table 6A. IC50 values are a mean of 'n' number of experiments.

Table 6A

DOM23h	On-rate ka1 (1/Ms)	Off-rate kd1 (1/s)	Affinity KD	ka Fold improvement	kd Fold improvement	KD Fold improvement	Mean IC50 (nM)*
439	2.08E+06	5.02E-02	2.42E-08				3570 (3)
439-20	4.43E+06	3.54E-03	7.99E-10	2.1	14.2	30.3	48 (10)
843	9.05E+05	3.43E-01	3.78E-07				1947 (3)
843-13	5.11E+06	2.11E-02	4.13E-09	5.6	16.2	91.7	540 (4)
855	3.35E+05	3.15E-01	9.41E-07				>25000 (3)
855-21	1.86E+06	3.36E-02	1.80E-08	5.6	9.4	52.3	18580 (6)

* number of experiments for calculation of mean IC50s provided in parenthesis

Affinity Matured Sequences

DOM23h-855-21 nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 203)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGATTACCTTTGAGAATACGAGTATGGGTTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACGTATTGATCCTAAGGGTAGTCATACATACTAC

ACAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAATACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGCGT
GAGTTGGGTAAGTCGTATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

5 DOM23h-855-21 amino acid sequence (SEQ ID NO: 204)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFENTSMGWVRQAPGKGLEWVSRIDPKGSHTYY
TDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRELGKSYFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-843-13 nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 205)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATCAGGATCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCC
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGCTATTGAGAGTGGTGGTCATAGGACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAATCAGAAT
15 AAGTCGGGGCGTTCGGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-843-13 amino acid sequence (SEQ ID NO: 206)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDQDRMWWVRQAPGKGLEWVSAIESGGHRTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANQNKSGRSGFDYWGQGLTVTVS

20 S

DOM23h-439-20 nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 207)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTG
25 TCTCAGTATTGATTCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACGGCATGCGGCTGGGGTTTCGGGTACTTATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

30 DOM23h-439-20 amino acid sequence (SEQ ID NO: 208)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRHAAGVSGTYFDYWGQGLTVTVSS

Example 6. Affinity maturation of DOM23h-271-7 lineage

35 DOM23h-271 amino acid sequence (SEQ ID NO:199)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANSRFDYWGQGTLVTVSS

DOM23h-271 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:200)

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTG
10 GTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-271-7 amino acid sequence (SEQ ID NO:201)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANSRFDYWGQGTLVTVSS

15

DOM23h-271-7 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:202)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCC
20 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

Domain antibody DOM23h-271(SEQ ID No:199) had been isolated from the phage libraries in a
25 previous selection campaign and variant DOM23h-271-7 (SEQ ID NO:201) was isolated following
error prone affinity maturation, both as described in WO 2011/012609DOM23h-271-7 (SEQ ID
NO:201) was selected for further affinity maturation based on its binding kinetics, sequence and
biophysical behaviour. Affinity maturation was performed using degenerative mutagenesis to re-
diversify the CDRs, and improved leads were identified using DNA display or phage display. Two
30 types of libraries were constructed to re-diversify the CDRs, and these are referred to as triplet and
doped libraries. To make the triplet libraries oligonucleotide primers were designed to cover each
CDR, and within each primer the codons for three amino acids were replaced with NNS codons, so
that three positions were diversified. Multiple oligonucleotides were used to cover all targeted amino
acids within each CDR: 2 for CDR1, 3 for CDR2 and 6 for CDR3. Complementary oligonucleotide
35 primers were used to amplify a sequence fragment containing each mutated CDR, and also an
overlapping sequence fragment covering the rest of the dAb coding sequence. These fragments
were mixed and assembled by splice extension overlap PCR to produce the full length dAb coding

sequence. This product was PCR amplified using primers DOM172 (SEQ ID NO:187) and DOM173 (SEQ ID NO:188), digested with SalI and NotI, and ligated into similarly cut pDOM4 (described above) for phage selections, or pIE2A2 (described in WO2006018650) for DNA Display selections. The doped libraries were constructed using a similar method, essentially as described in

5 WO2006018650. A single degenerate oligonucleotide primer was used to cover all mutations within each CDR. Within each primer the amino acids to be diversified were specified using degenerate codons to specify multiple amino acids. Five amino acids were diversified in CDR1, 7 in CDR2, and 13 in CDR3. In the primers the following degenerate coding is used: 'a' = 91 %A + 3 %T + 3 %G + 3 %C; 'g' = 91 %G + 3 %T + 3 %C + 3 %A; 'c' = 91 %C + 3 %T + 3 %G + 3 %A; 't' = 91 %T + 3 %A + 3 %G + 3 %C; 'S' = 50% G and 50% C. Capital letters indicate 100% of the specified nucleotide. The primers used were:

271-7R1deg CDR1

(GCAGCCTCCGGATTACCTTTacSgaStatagSATGtgSTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGG) (SEQ ID NO:189);

271-7R2deg CDR2

15 (GGGTCTCGAGTGGGTCTCAgcSATTgaScsSatSggSaaScgSACATACTACGCAGACTCCGTG)

(SEQ ID NO:190);

271-7R3deg CDR3:

(GCGGTATATTACTGTGCGAAAcasatScsSggScgSaaStgSacSgcSaaStcScgSttSGACTACTGGGGTCAGGG)

(SEQ ID NO:191).

20 The degenerate library primers were used in the same way as the triplet primers. Each diversified CDR was amplified separately and then combined with a parental sequence fragment using splice extension overlap. The fragments were subcloned to pDOM4 and pIE2A2 using SalI and NotI.

25 DNA Display

Selections were performed using in vitro compartmentalisation in emulsions and DNA display using the scArc DNA binding protein essentially as described in WO2006018650. Briefly, TGFbRII-FC antigen was biotinylated using a 5:1 molar ratio of Biotin and the EZ-LINK™ Sulpho-NHS-LC-Biotin kit (Thermo #21327). A DNA fragment containing the Arc operator sequences and expression

30 cassette containing the diversified dAb library was PCR amplified from the pIE2A2 vector using flanking primers. The product was purified from an eGel (Invitrogen) and diluted to 1.7 or 0.85nM in 1mg/ml BSA. For selection of improved binders the doped and Triplet libraries were processed separately under slightly different conditions. The Triplet CDR libraries were combined to give pooled CDR 1, 2 or 3 libraries. Ten rounds of selection were used for each type of library. For both

35 methods, after 2 selection cycles, the diversified CDR's were amplified and recombined by splice overlap extension PCR to produce a 4th library with mutations in all 3 CDRs.

For the doped libraries 5×10^8 copies of DNA were mixed with 50 μ l of EXPRESSWAY™ In vitro translation mix (Invitrogen). Each reaction contained 10.0 μ l SLYD™ extract; 10.0 μ l 2.5x reaction buffer; 12.5 μ l 2x feed buffer; 1.0 μ l Methionine (75 mM); 1.25 μ l Amino Acid mix (50 mM); 15 μ l H₂O; 0.5 μ l T7 Polymerase; 0.25 μ l anti-HA mAb 3F10 (Roche, cat. 1 867 423); and 1.5 μ l Glutathione (100 mM) (Sigma). This was added to 800 μ l of hydrophobic phase (4.5% SPAN™-80, (Fluka) + 0.5% Triton X-100 (Sigma) in Light white mineral oil (Sigma)) in a 4ml glass vial (CHROMACOL™ 4SV P837) and stirred at 2000rpm for 4-5 minutes. The tubes were sealed and incubated for 3 hours at 30°C. All subsequent steps were done at room temperature. To extract the DNA-protein complexes 200 μ l of C+ buffer (10 mM Tris, 0.1 M KCl, 0.05% TWEEN™-20, 5 mM MgCl₂, 1% BSA, pH 7.4) and 500 μ l of Hexane was added to the vial, mixed and transferred to a microtube and centrifuged at 13000g for 1 minute. The organic phase was removed and the aqueous phase re-extracted with 800 μ l of Hexane 3-5 more times until the interface was almost clear. For the first 5 rounds of selections the biotinylated TGFbRII-FC was pre-bound to Streptavidin DYNAbEads™ (Invitrogen) and added to the extracted complexes to give an antigen concentration equivalent to 40, 40, 10, 5 and 5 nM antigen (rounds 1, 2, 3, 4 and 5 respectively). T1 beads were used for selections 1-3, and C1 for selections 4 and 5. After 30 minutes incubation the beads were washed 3-5 times with C+ buffer. The DNA complexes remaining bound to the beads were then recovered by PCR with flanking primers. Selection rounds 6-10 were referred to as 'soluble' selections, where the Biotinylated TGFbRII-FC was added directly to the complexes after extraction to give a concentration of 5, 5, 4, 5 and 5 nM (rounds 6, 7, 8, 9 and 10 respectively), and incubated for 30 minutes to allow binding to be established. Non-biotinylated TGFbRII-FC was then added as a competitor to 74, 750, 400, 250 and 250 nM (rounds 6, 7, 8, 9 and 10 respectively), and incubated for 15, 15, 30, 30 and 30 minutes (rounds 6, 7, 8, 9 and 10 respectively). In rounds 9 and 10 a double stranded oligonucleotide containing the ARC operator sequence was included at 50nM in the C+ buffer used in the hexane extractions to reduce cross-reactions between any non-complexed DNA and excess protein released from the emulsions. After the competition period 10 μ l of C1 Streptavidin DYNAbEads™ were added. After 10 minutes the beads were washed 5 times with Buffer C+ and the bound complexes recovered by PCR with flanking primers as previously described. The PCR product was purified on an eGel and used for the next selection cycle. Following the 10th selection the recovered product was cut with SalI and NotI enzymes, and cloned into similarly cut pDOM13 for expression.

The triplet libraries were selected using a similar method, except that 1×10^9 DNA copies were used in the first round selection, and 5×10^8 thereafter. Also, the incubation time for protein expression in the emulsion was reduced to 2 hours. Soluble Biotinylated TGFbRII FC was used in all ten selection rounds at 25, 10, 5, 5, 5, 5, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5nM respectively. The Biotinylated target was incubated with the extracted complexes for 30 minutes. In selection rounds 5-10 the non-biotinylated TGFbRII-FC competitor was added to a final concentration of 250nM for 15, 30, 60, 60, 75, and 90 minutes respectively before addition of C1 streptavidin DYNAbEads™. In round 5

competition was at room temperature, but from round 6 the competition temperature was increased to 30°C. The Arc Operator decoy oligo was included in selection rounds 1-4 to reduce cross complexing of defective DNA.

Following selections the dAb encoding inserts were excised from the DNA display expression cassettes using SalI and NotI, and cloned into the pDOM13 bacterial expression vector. The dAbs were sequenced and expressed in TB ONEX™ medium and supernatants were screened by BIACORE™ to identify clones with improved off-rates when compared to parent. Clones with improved off-rates were expressed and purified, and were assessed for affinity by BIACORE™ and potency in the cell sensor assay. Clones giving poor kinetic profiles, containing unfavourable sequence motifs, or giving very low yields were not pursued. Three were selected to be of further interest. Clones DOM23h-271-21 (SEQ ID NO:29) and DOM23h-271-22 (SEQ ID NO:30) were isolated from doped library selections. Clone DOM23h-271-27 (SEQ ID NO:31) was isolated from a triplet library selection. The affinity of the selected clones for human TGFβRII-FC is shown in table 7.

Table 7

	$K_a(M^{-1}.s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	KD (nM)
DOM23h-271-7*	5.37E+6	5.10E-2	9.49
DOM23h-271-21	3.21E+6	4.72E-4	0.147
DOM23h-271-22	3.22E+6	9.19E-4	0.286
DOM23h-271-27	2.17E+6	1.26E-3	0.578

*N.B. values in the above table are for ranking purposes only since the fitting for DOM23h-271-7 to the 1:1 model was poor, although the affinity matured samples fitted well to this model.

Phage Display:

Triplet or doped libraries in separate CDR1, CDR2 and CDR3 pools were subjected to rounds of phage selection as described above against either biotinylated human TGF-β RII/Fc antigen over 4 rounds in concentrations of 10 nM, 1 nM, 100 pM and 20 pM respectively, or two rounds of selection using 20pM followed by 2pM antigen. Inserts from phage selections were cloned into the pDOM10 expression vector and supernatants with off rates improved over parent were selected for further study. Domain antibodies were expressed and purified their affinity and bioactivity against human TGF-β RII/Fc antigen tested on the BIACORE™ T100 and in the Cell sensor assay described above (data not shown). The affinity of the selected clones for human TGFβRII-FC is shown in table 8.

Table 8

Sample	$K_a(M^{-1}.s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	KD (M)
--------	----------------------	---------------	--------

271-101	3.73E+06	0.02014	5.40E-09
271-102	9.35E+06	0.01531	1.64E-09
271-105a*	3.29E+06	0.00747	2.27E-09
271-105b*	3.07E+06	0.007977	2.60E-09
271-106a*	7.39E+06	0.02333	3.16E-09
271-106b*	6.77E+06	0.01947	2.88E-09
271-114	1.04E+07	0.07084	6.80E-09
271-7a*	3.04E+06	0.04193	1.38E-08
271-7b*	2.42E+06	0.04448	1.84E-08

* The designation "a" and "b" refer to separate supernatants resulting from different colonies of the numbered clones.

- 5 The sequence of the selected clones with improved activity was determined and the full sequences and CDR sequences are shown below.

DOM23h-271-21 amino acid sequence (SEQ ID NO:29)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN
10 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPGRKWTAKFRWDYWGQGTLVIVSS

DOM23h-271-21 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:67)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTACCGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
15 TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGATGCCGGGCGGGAAGTGGACGGCCAAGTTCCGCTGGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCATCGTCTCGAGC

20 DOM23h-271-22 amino acid sequence (SEQ ID NO:30)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPGQKWMASRFDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-271-22 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:68)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
5 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGATGCCCCGGCCAGAAGTGGATGGCCAAGTCCCCTTCGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-271-27 amino acid sequence (SEQ ID NO:31)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGQKTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANSRFDYWGQGLVIVSS

DOM23h-271-27 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:69)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCAGAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCATCGTCTCGAGC

20

DOM23h-271-101 amino acid sequence (SEQ ID NO:32)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANGRKDYWGQGLVTVSS

25 DOM23h-271-101 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:70)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
30 GTGCGAAACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATGGTCGTAAGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-271-102 amino acid sequence (SEQ ID NO:33)

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANSRFDYWGQGLVTVSS

DOM23h-271-102 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:71)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
5 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-271-105 amino acid sequence (SEQ ID NO:34)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGQRWTGNSRFDYWGQGT
LTVSS

DOM23h-271-105 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:72)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGATTCCGGGGCAGCGGTGGACTGGTAATTCGCGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
20 GTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-271-106 amino acid sequence (SEQ ID NO:35)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQFPGRKWTANSRSDYWGQGT LTVSS

25

DOM23h-271-106 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:73)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
30 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGTTTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-271-114 amino acid sequence (SEQ ID NO:36)

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKGTANSRFDYWGQGT LTVSS

DOM23h-271-114 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:74)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
5 TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGATTCCGGGGCGTAAGGGAACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

10 Table 9. CDR sequences of 271 affinity matured clones with improved activity

	CDR1 (Kabat 26-35)	CDR2 (Kabat 50-65)	CDR3 (Kabat 95-102)
DOM23h-271-21	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO:105)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO:141)	QMPGRKWTAKFRWDY (SEQ ID NO:177)
DOM23h-271-22	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO:106)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO:142)	QMPGQKWMASRFDY (SEQ ID NO:178)
DOM23h-271-27	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO:107)	AIEPIGQKTYADSVKG (SEQ ID NO:143)	QIPGRKWTANSRFDY (SEQ ID NO:179)
DOM23h-271-101	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO:108)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO:144)	QIPGRKWTANGRKDY (SEQ ID NO:180)
DOM23h-271-102	GSTFTEYRMW (SEQ ID NO:109)	AIEPIGHRYYADSVKG (SEQ ID NO:145)	QIPGRKWTANSRFDY (SEQ ID NO:181)
DOM23h-271-105	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO:110)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO:146)	QIPGQRWTGNSRFDY (SEQ ID NO:182)
DOM23h-271-106	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO:111)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO:147)	QFPGRKWTANSRSDY (SEQ ID NO:183)
DOM23h-271-114	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO:112)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO:148)	QIPGRKGTANSRFDY (SEQ ID NO:184)

N.B CDR2 and CDR3 are as defined by Kabat. CDR1 is defined by a combination of the Kabat and Chothia methods.

15 Generic method for binding kinetics – T100

BIACORE™ analysis was carried out using a capture surface on a CM4 chip. Anti-human IgG was used as the capturing agent and coupled to a CM4 biosensor chip by primary amine coupling. The Antigen molecule fused to the human Fc was captured on this immobilised surface to a level from 250 to 300 resonance units and defined concentrations of Domain antibodies diluted in running
20 buffer were passed over this captured surface. An injection of buffer over the captured antigen surface was used for double referencing. The captured surface was regenerated, after each domain antibody injection using 3M magnesium chloride solution; the regeneration removed the captured antigen but did not significantly affect the ability of the surface to capture antigen in a subsequent cycle. All runs were carried out at 25°C using HBS-EP buffer as running buffer. Data were generated
25 using the BIACORE™ T100 and fitted to the 1:1 binding model inherent to the software. When non-

specific binding was seen at the top concentration, the binding curve at this concentration was removed from the analysis set.

Further diversification of CDR3

- 5 The DOM23h-271-7 derivatives with the highest affinity contained methionines in position 96 and 100B. These positions, along with positions 99, 100D, 100E and 100G were diversified using NNK mutagenesis to determine whether substitutions could be made. The NNK library was constructed as described above using primer PEP-26-F to introduce diversity at the selected positions in DOM23h-271-22 or DOM23h-271-102 background. DOM23h-271-102 contains mutations at position 27 and
10 55 that confer improved affinity over DOM23h-271-7.

PEP-26-F (SEQ ID NO: 209)

GCGGTATATTACTGTGCGAAACAGNNSCCCGGCNNSAAGTGGNNSGCCNNSNNSCGCNNSGACTACTGGGG
TCAGGGAACC

- 15 DNA display libraries were constructed and selected on biotinylated hTGFbRII-FC as described above using concentrations of 5nM; 0.5nM; 0.1nM; 0.1nM; 0.1nM; and 0.1nM in successive rounds. In selection rounds 4-6 the non-biotinylated TGFbRII-FC competitor was added to a final concentration of 100nM for 60, 90, and 90 minutes respectively before addition of C1 streptavidin DYNAbeads™.
- 20 Following selection the dAb inserts were PCR amplified using primers PeIB NcoVh and PEP011, cut with NcoI and EcoRI, and cloned into the bacterial expression vector pC10.

PeIB NcoVh (SEQ ID NO: 210) GCCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGG

PEP011 (SEQ ID NO: 211) GAATTCGCGGCCGCCTATTAGCTCGAGACGGTGACCAGGG

- 25 The cloned products were expressed and screened by Biacore. Clones with off-rates similar or better than DOM23h-271-22 were sequenced, purified, and assessed for affinity by BIACORE™ and potency in the cell sensor assay. Clones giving poor kinetic profiles, containing unfavourable sequence motifs, or giving very low yields were not pursued. DOM23h-271-50 was selected for
30 further affinity maturation.

DOM-271-50 nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 212)

- GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
35 TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT

GTGCGAAACAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGCTCGCCCGGGGCGCTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

DOM-271-50 amino acid sequence (SEQ ID NO: 213 and duplicate entry SEQ ID NO:214)

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWLARGRLDYWGQGLTVTVSS

Example 7. Introduction of mutations into TGFbRII dAb sequences (DOM23h-271 lineage) at positions 61 and 64

10 The D61N and K64R double mutations have previously been introduced into various TGFR β II dAb lineages and have been shown to improve potency (WO2011/012609). These mutations were introduced into TGFbRII dAb DOM23h-271 lineages to see if a similar improvement in potency could be achieved. Alternative mutations at this position were explored to determine whether further enhancements in potency could be achieved.

15 Mutations were introduced into the DOM23h-271 (SEQ ID NO:199) backbone by overlap extension using the polymerase chain reaction (PCR) (Ho, et al., Gene 1989 77(1)); complementary oligonucleotide primers were used to generate two DNA fragments having overlapping or complementary ends. These fragments were combined in a subsequent assembly PCR in which the overlapping ends anneal, allowing the 3' overlap of each strand to serve as a primer for the 3' extension of the complementary strand and the resulting fusion product to be amplified further by
20 PCR. Specific alterations in the nucleotide sequence were introduced by incorporating nucleotide changes into the overlapping oligonucleotide primers. The target dAb gene fragments were amplified by two separate PCRs using SUPERTAQ™ polymerase (HT Biotechnology). DOM23h-271 was selected as it has a low affinity for TGFbRII so that improvements in affinity were clearly
25 measurable using BIACORE™. The mutations at positions 61 and 64 were encoded using a degenerate oligo-nucleotide to mutate both positions in combination, with the intention of using affinity selection to enrich for mutants with improved binding affinity. As the NR mutation is known to dominate this mutation was avoided in the library by employing a restricted codon, NNG, at position 61. This codon encodes 13 amino acids but does not include the amino acids F, Y, C, H, I, N
30 or D. Free Cys was not favoured within a dAb, and asparagine was also not wanted at this position, so only 5 desirable amino acids combinations were excluded. At position 64 an NNK codon was used to provide the full range of possible amino acids.

The oligonucleotide pairs used to introduce the mutations were PE008 (flanks the 5' start of the dAb gene: 5'- TTGCAGGCGTGGCAACAGCGTCGACAGAGGTGCAGCTGTTGGAG-3') (SEQ ID
35 NO:192) with 271-6164 R (5'-GCGTAGTATGTACGATTACCAATCGG-3') (SEQ ID NO:193) and mutated 271-6164 deg-F (mutated residues underlined: 5'- GGTAATCGTACATACTACGCANNGTCCGTGNNKGGCCGGTTCACCATCTCCCGC-3') (SEQ ID NO:194)

with AS1309 (flanks the 3' end of the dAb gene: 5'-TGTGTGTGTGTGGCGGCCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTCCCTGACCCCA-3') (SEQ ID NO:195). The two PCR fragments were recombined in an assembly PCR using SUPERTAQ™ DNA polymerase without the addition of primers. The fusion product was then amplified by the addition of flanking primers PE008 and AS1309 to the PCR reaction. The mutated dAb was digested with Sal I and Not I restriction endonucleases, ligated into similarly cut pDOM13 expression vector and transformed into E.Coli HB2151 cells. The D61N, K64R mutation was also introduced into DOM23h-271 in the same way, but substituting primer 271-6164 NR-F (5'-GGTAATCGTACATACTACGCAAACCTCCGTGCGCGGCCGGTTCACCATCTCCCGC-3') (SEQ ID NO:196) for 271-6164 deg-F. The mutated dAbs were identified by sequencing. 129 clones with novel combinations of mutations at position 61 and 64 were identified, though 11 carried additional mutations from PCR errors. These are shown in table 11. N.B. Clones with enhanced affinity are underlined. Clones with additional mutations are indicated by asterisks

To determine the effect of the mutations the selected clones were expressed in TB ONEX™ in 96 well plates for 72 hours at 30°C or 24 hours at 37°C. The supernatants were clarified by centrifugation and filtered through a 0.22µm filter before off-rate evaluation by BIACORE™.

BIACORE™ A100 analysis was carried out using a capture surface on a CM5 chip. Anti-human IgG was used as the capturing agent and coupled to a CM5 biosensor chip by primary amine coupling. The Antigen molecule fused to the human Fc was captured on this immobilised surface to a level from 200 to 300 resonance units and supernatants or purified domain antibodies were passed over this captured surface. An injection of media or buffer over the captured antigen surface was used for double referencing. On each flow cell, a protein A spot allowed to confirm the presence of domain antibody on each sample injected. The surfaces were regenerated, after each domain antibody injection using 3M magnesium chloride solution; the regeneration removed the captured antigen but did not significantly affect the ability of the surface to capture antigen in a subsequent cycle. All runs were carried out at 25°C using HBS-EP buffer as running buffer. Data were generated using the BIACORE™ A100 and analyzed using its inherent software. Kinetics from purified samples were fitted to the 1:1 binding model while supernatant off-rates were analyzed using the 1:1 dissociation model and / or using the binding level and the stability level of each sample in comparison to the parent molecule.

Of clones tested 46 were identified with improved off-rate by comparison to the parent DOM23h-271 dAb, as indicated in table 11. Mutations D61R and D61K were found to enhance binding independent of mutations at position 64. A number of combinations appeared better than the original D61N, K64R mutations, and these included RE, RM, RF and RY.

A selection of mutants with improved off-rate were purified and subjected to full BIACORE™ A100 kinetic analysis to determine their affinity (Table 10). The thermal stability of the mutants was also determined by generation of melting profiles in the presence of SYPRO™ Orange (Invitrogen).

Briefly, the purified dAbs were diluted to 50 and 100ug/ml in a 1:500 dilution of SYPRO™ Orange in PBS, and subjected to a 30-90°C melt curve in a Mini OPTICON™ PCR machine (BioRad). The T_m of the major positive transition was determined at each concentration and used to calculate an estimated T_m value at 1mg/ml as an indication of the melting temperature for comparison (Table 10).

The mutations D61R, K64D and D61R, K64F were selected as they had a good improvement in affinity for a reduced impact in T_m. These mutations were transferred to an affinity matured DOM23h-271 derivative DOM23h-271-22 (SEQ ID NO:30) to make dAbs DOM23h-271-39 (SEQ ID NO:37) and DOM23h-271-40 (SEQ ID NO:38). These mutations were found to give an enhancement in affinity by BIACORE™ including cross reactivity with murine TGFbRIIFC, and enhanced potency by cell sensor assay. However the mutations were also found to reduce the T_m as measured by DSC, and increase aggregation of the dabs in PBS, as measured by SEC MALLS. These assays were carried out as described above, except that the buffer for SEC MALLS was 0.4M NaCl, 0.1M Sodium Phosphate and 10% isopropanol pH7. These results are summarized in table 12 (mean values are given for the human cell sensor assay and the mouse 3T3 luciferase assay).

Sequences of dabs referred to in this example are given below:

DOM23h-271-39 amino acid sequence (SEQ ID NO:37)

EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYARSVDGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPGQKWMMAKS RFDYWGQGTLVTVSS

DOM23h-271-39 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:75)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCC
GGATTACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCAGCG
ATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCACGCTCCGTGGACGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGATGCC
CGGCCAGAAAGTGGATGGCCAAGTCCCGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM23h-271-40 amino acid sequence (SEQ ID NO:38)

EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYARSVFG RFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPGQKWMMAKS RFDYWGQGTLVTVSS

DOM23h-271-40 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:76)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCC
GGATTACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCAGCG

ATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCACGCTCCGTGTTTCGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCA
 AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGATGCC
 CGGCCAGAAGTGGATGGCCAAGTCCCGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

5 Table 10

Description	Mutation	Est. T _m 1mg/ml	KD (nM)
1A2	RA	53.08	2.24
1D9	RD	52.35	1.17
3F11	RE	53.08	3.27
1G11	RM	51.81	0.97
3C9	RF	54.08	1.39
1E6	RY	49.62	1.17
1B11	RV	53.41	1.88
3D9	KG	48.69	4.34
1D5	KF	48.09	3.69
3D4	KT	54.74	4.26
1H11	LW	53.68	4.17
1B2	VW	52.68	1.79
2C12	NR	51.49	3.34
271	DK	58.21	N/D

N.B. the mutation corresponds to 'XY' wherein X is position 61 and Y is position 64

Table 1.1. Mutations inserted into DOM23h-271 at positions 61 and 64.

61\64	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A		<u>1D6*</u>									<u>1C10</u>	<u>3B11</u>		<u>3C10*</u>		<u>3B10</u>		<u>1A12</u>		<u>3G3*</u>
R	<u>1A2</u>	<u>1A3</u>	<u>3F4</u>	<u>1D9</u>	<u>2C4</u>	<u>1A8</u>	<u>3F11</u>	<u>3G8</u>		<u>1A4</u>		<u>3C2</u>	<u>1G11</u>	<u>3C9*</u>		<u>2F5</u>	<u>1H1</u>	<u>1H2</u>	<u>1E6</u>	<u>1B11</u>
N		<u>2C12</u>																		
D												<u>3H6 (wt)</u>								
C																				
Q	<u>1B6*</u>	<u>1E8</u>						<u>1B10</u>		<u>1H12</u>	<u>1D11</u>						<u>1C8</u>	<u>3F7</u>	<u>2C10</u>	
E		<u>2A3</u>			<u>1F12</u>			<u>2G4</u>			<u>3H7</u>				<u>1F10</u>	<u>2B11</u>	<u>3D6</u>			
G	<u>1D1</u>	<u>1B5</u>				<u>3B12</u>		<u>1E5</u>			<u>3G11</u>	<u>3D12</u>				<u>2B6</u>	<u>2G5</u>	<u>2D5</u>		
H																				
I																				
L	<u>1D2</u>	<u>3E11</u>	<u>2A9</u>			<u>1B4</u>	<u>1H3</u>	<u>1A9</u>		<u>1F1</u>	<u>1G9</u>	<u>1H10</u>	<u>1C9</u>	<u>2C9</u>	<u>1H5</u>	<u>1G2</u>	<u>1E4</u>	<u>1H11</u>		
K		<u>2E5</u>					<u>2B4</u>	<u>3D9</u>				<u>3E12</u>		<u>1D5</u>	<u>1G7</u>	<u>2E9*</u>	<u>3D4</u>		<u>1B1</u>	<u>1F2</u>
M						<u>1G6</u>		<u>2D3*</u>			<u>1E7</u>	<u>2E6</u>	<u>3C12</u>	<u>2F6</u>	<u>3H1</u>	<u>3B5*</u>	<u>1A6</u>		<u>1E11</u>	<u>3B8*</u>
F																				
P			<u>2A8</u>				<u>1A5</u>	<u>2C11</u>						<u>3H2</u>		<u>1G5</u>			<u>3G12</u>	
S		<u>3C3</u>		<u>3E7</u>				<u>3E5</u>		<u>1H4</u>		<u>2B10</u>	<u>1C11</u>	<u>1B7</u>	<u>2C8</u>	<u>3B1</u>		<u>3D5</u>		
T		<u>1E3</u>	<u>1D10*</u>			<u>2C1</u>		<u>1C1</u>		<u>2A5</u>	<u>3G9</u>			<u>2H10</u>			<u>2A4</u>		<u>3D11</u>	
W	<u>2F10</u>	<u>1E12</u>				<u>2C2</u>		<u>2A2</u>			<u>2A6</u>		<u>1D4</u>		<u>3B2</u>		<u>2B1</u>			
Y																				
V		<u>1C12</u>			<u>2B9</u>	<u>1H6</u>	<u>1D3*</u>	<u>3C1</u>		<u>2G2</u>	<u>2F7</u>	<u>1F7</u>			<u>2H4</u>	<u>3C7</u>		<u>1B2</u>		<u>2G6</u>

Clones with improved off-rate are underlined. Clones with additional mutations are indicated by asterisks

Table 12

	Mutation	Human Cell sensor	Mouse 3T3 Luciferase assay	Human TGFbRII	Cyno TGFbRII	Mouse TGFbRII	Tm (DSC)	Aggregation (SEC-MALS)
		IC50 (nM)	IC50 (nM)	KD (pM)	KD (pM)	KD (pM)		
DOM23h-271- 22	-	39.01	>17780	202.00	225.00	-	60	91.8% Monomer 8.2% Dimer
DOM23h-271- 39	RD	1.17	11120	14.90	24.00	1780.00	57.5	51.6% M/D Eq 38.5% D/T Eq + aggregates
DOM23h-271- 40	RF	0.53	1200	9.99	11.25	548.50	55.6	91.6% M/D Eq 8.4% Trimer / oligomer

Example 8 Affinity maturation by CDR diversification of lineages DOM23h-439-20, DOM23h-843-13, DOM23h-855-21 and DOM23h-271-50

Domain antibodies DOM23h-855-21 (SEQ ID NO:204) and DOM23h-843-13 (SEQ ID NO:206) were isolated from the error prone affinity maturation carried out on naïve clones DOM23h-855 (SEQ ID NO:13) and DOM23h-843 (SEQ ID NO:10) respectively, as detailed in example 5. Domain antibody DOM23h-439 was isolated from phage libraries in a previous selection campaign described in WO 2011/012609 and variant DOM23h-439-20 (SEQ ID NO:208) was subsequently isolated by error prone affinity maturation as detailed in example 5. Domain antibody DOM23h-271-50 (SEQ ID NO:214) was generated by CDR3 re-diversification of CDR-directed affinity matured variant DOM23h-271-22 (SEQ ID NO:30) as detailed in Example 6. DOM23h-855-21, DOM23h-843-13, DOM23h-439-20 and DOM23h-271-50 were all selected for further affinity maturation based on their binding kinetics, potency in the SBE-bla HEK 293T cell sensor assay, sequence and biophysical behaviour. Affinity maturation was performed using degenerative mutagenesis to re-diversify the CDRs, and improved leads were identified using phage display. Diversity was introduced into the CDRs by construction of either doped or NNK libraries.

DOM23h-271-50 was affinity matured using NNK libraries (saturation mutagenesis), oligonucleotide primers were designed to cover each CDR and within each primer the codons for 5 amino acids were replaced with NNK codons so that 5 positions are diversified simultaneously. Single or multiple oligonucleotides were used to cover all targeted amino acids within each CDR; 1 for CDR1, 2 for CDR2 and 3 for CDR3. CDR-directed affinity maturation was achieved using polymerase chain reaction (PCR); Complementary oligonucleotide primers were used to amplify a sequence fragment containing each mutated CDR, and also an overlapping sequence fragment covering the rest of the dAb coding sequence. These fragments were mixed and assembled by splice extension overlap PCR to produce the full length dAb coding sequence. This product was PCR amplified using primers PelB NcoVh (SEQ ID NO:210) and PEP044 (5'-GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGGCCGCATAATAAGAATTCA-3' SEQ ID NO:215), digested with NcoI and NotI, and ligated into NotI and NcoI digested pDOM4-gene3-pelB hybrid vector. pDOM4-gene3-pelB hybrid vector is a modified version of the pDOM4 vector described above but has been modified to replace the GAS leader sequence with the pelB (pectate lyase B) signal peptide.

The domain antibodies DOM23h-855-21, DOM23h-843-13 and DOM23h-439-20 were affinity matured using doped libraries. The doped libraries were constructed essentially as described above and in WO2006018650. A single degenerate oligonucleotide primer was used to cover all mutations within each CDR. Within each primer the amino acids to be diversified were specified using degenerate codons to encode multiple amino acids. The following degenerate coding was used: 'a' = 85 %A + 5 %T + 5 %G + 5 %C; 'g' = 85 %G + 5 %T + 5 %C + 5 %A; 'c' = 85 %C + 5 %T + 5 %G + 5 %A; 't' = 85 %T + 5 %A + 5 %G + 5 %C; 'S' = 50% G and 50% C. Capital letters indicate 100% of the specified nucleotide. For the DOM23h-439-20 doped library five amino acids

were diversified in CDR1, 6 in CDR2 and 11 in CDR3 to include the phenylalanine at position 100. For the DOM23h-855-21 doped library five amino acids were diversified in CDR1, 7 in CDR2 and 8 in CDR3. For the DOM23h-843-13 doped library five amino acids were diversified in CDR1, 6 in CDR2 and 8 in CDR3, position 94 before the CDR3 was also diversified by introducing the codon VRK. For each of the dAbs, 4 doped libraries were constructed, one to diversify CDR1, one to diversify CDR2, one to diversify CDR3 and a fourth where all CDRs were diversified. The degenerate library primers were used in the same way as the triplet primers. Each diversified CDR was amplified separately and then combined with a parental sequence fragment using splice extension overlap, the full length product was amplified using primers PelB NcoVh (SEQ ID NO:210) and DOM173 (SEQ ID NO:188). The fragments were subcloned to pDOM4-gene3-pelB hybrid vector using NcoI and NotI.

Degenerate primer sequences:

23h-439-20 CDRH1 (SEQ ID NO:216)

5'-GCAGCCTCCGGATTCACCTTTggSacSgagcagATGtggTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG-3'

23h-439-20 CDRH2 (SEQ ID NO:217)

5'-AAGGGTCTAGAGTTTGTCTCAcgSATTgattcScsSGGTggScgSACATACTACGCAGACTCCGTG-3'

23h-439-20 CDRH3 (SEQ ID NO:218)

5'-GCGGTATATTACTGTGCGAAAcgScatgcSgcSggSgtStcSggSacStaYtttGACTACTGGGGTCAGGGAACC-3'

23h-843-13 CDRH1 (SEQ ID NO:219)

5'-GCAGCCTCCGGATTCACCTTTgatcaggatcgSATGtggTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG-3'

23h-843-13 CDRH2 (SEQ ID NO:220)

5'-AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAgcSATTgagtcSggSGGTcatcgSACATACTACGCAGACTCCGTG-3'

23h-843-13 CDRH3 (SEQ ID NO:221)

5'-ACCGCGGTATATTACTGTGCGVRKcagaataagtcSggScgStcSggSTTTGACTACTGGGGTCAGGGA-3'

23h-855-21 CDRH1 (SEQ ID NO:222)

5'-GCAGCCTCCGGATTCACCTTTgagaatacStcSATGggSTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG-3'

23h-855-21 CDRH2 (SEQ ID NO:223)

5'-

AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAcgSATTgatccSaagGGTtcScatACATACTACacSGACTCCGTGAAGGGCCGGT
TCACC-3'

5 23h-855-21 CDRH3 (SEQ ID NO:224)

5'-GCGGTATATTACTGTGCGAAAcagcgSgagctSggSaagtcStaYTTTGACTACTGGGGTCAGGGA-3'

H1-271-43 R (SEQ ID NO:225)

5'-GCAGCCTCCGGATTACCTTTNNKNNKNNKNNKATGNNKTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTC-

10 3'

H2p1-271-43F (SEQ ID NO:226)

5'-

CCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCANNKATTNNKNNKNNKGGTNNKCGTACATACTACG

15 CAGACTCCG-3'

H2p2-271-43 F (SEQ ID NO:227)

5'-

CCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCAGCGATTGAGNNKNNKNNKNNKNNKACATACTACG

20 CAGACTCCG-3'

H3p1-271-43 F (SEQ ID NO:228)

5'-

ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAANNKNNKNNKNNKNNKAAGTGGATGGCCGTGGGCCGCTTGGA

25 GGGTCAGGG-3'

H3p2-271-43 F (SEQ ID NO:229)

5'-

ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGAAGCCCNKNNKNNKNNKNNKGCCGTGGGCCGCTTGGA

30 GGGTCAGGG-3'

H3p3-271-43 F (SEQ ID NO:230)

5'-

ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGAAGCCCGGCCAGAAAGTGGNNKNNKNNKNNKNNKTTGGA

35 GGGTCAGGG-3'

Phage Display:

NNK or doped libraries in separate CDR1, CDR2, CDR3 and combined CDR1, 2 and 3 pools were subjected to at least 6 rounds of selection against 100nM, 10 nM, 1 nM, 1 nM, 0.1 nM and 0.1 nM (rounds 1, 2, 3, 4, 5 and 6 respectively) biotinylated monomeric human TGF- β RII antigen as described in example 1 with the following deviation to the block step; the human IgG Fc fragment which was previously added in example 1 was omitted and the block step performed for a minimum of 20 minutes. In rounds 4 and 6 of selection competition was introduced by incubation with 100nM non-biotinylated antigen for 30 min (rounds 4 and 6) following the incubation step with the labelled antigen. For DOM 23h-439-20 (CDR1, CDR3 and combined pools) and DOM 23h-855-21 (CDR3) a seventh round of selection was carried out against 0.1 nM biotinylated monomeric human TGF- β RII antigen and 100 nM competition for 120 min or 20 pM biotinylated monomeric human TGF- β RII antigen with 100 nM competition for 30 min. Phage were amplified between rounds of selection by centrifugation of an overnight culture of phage infected TG1 cells for 30 minutes at 4000 g. 40 ml of supernatant containing the amplified phage was added to 10ml of PEG/NaCl (20% v/w PEG 8000 + 2.5M NaCl) and incubated on ice for 60 minutes. The samples were centrifuged for 40 minutes at 4000 g to pellet the precipitated phage. The supernatant was discarded and the phage pellet was resuspended in 1ml 15% v/v glycerol/PBS. The phage sample was transferred to 2 ml Eppendorf tubes and centrifuged for 10 minutes to remove any remaining bacterial cell debris. Diversified domain antibody Vh genes from the phage selections were PCR amplified using primers PEP011VHStopNotIR (5'-CCCTGGTCACCGTCTCGAGCTAATAGGCGGCCGGAATTC-3' (SEQ ID NO: 231) and Nco1 VH F (5'-TATCGTCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 232) , digested with NcoI and NotI restriction endonucleases and ligated into the pC10 vector also digested with NcoI and NotI. pC10 is a plasmid vector based on pUC119 vector, with expression under the control an enhanced LacZ promoter designed for soluble expression of dAbs. Expression of dAbs into the supernatant is enabled by fusion of the dAb gene to the pelB signal peptide at the N-terminal end. The ligation products were transformed into chemically competent E. coli HB2151 cells and plated on nutrient agar plates supplemented with 100 μ g/ml of carbenicillin. Individual clones were picked and expressed in overnight express auto-induction medium (high-level protein expression system, Novagen), supplemented with 100 μ g/ml carbenicillin in 96-well plates and grown with shaking at 250 rpm for either 66 hours at 30°C or 24 hours at 37°C. Expression plates were then centrifuged at 3500g for 15 minutes and the supernatants filtered using 0.45 μ filter plates (Millipore). Supernatants containing the domain antibodies were screened on the BIACORE™ B4000 against human TGF- β RII and human TGF- β RII/Fc to determine the off-rate (Kd) (data not shown). Biotinylated antigens were captured on an SA chip in accordance with the manufacturer's instructions, analysis was carried out at 25°C using HBS-EP buffer. Samples were run on BIACORE™ at a flow rate of 30 μ l / min. Regeneration of the chip was achieved using glycine at low pH. The data (not shown) were analysed for off-rate by fitting the dissociation phase to the 1:1 dissociation

model inherent to the software, supernatants were also analyzed for protein A binding to estimate levels of expression. Domain antibodies with off rates improved over parent were selected for further study. Improved clones were expressed in overnight express autoinduction medium (ONEX™, Novagen) supplemented with 100 ug/ml carbenicillin and antifoam (Sigma) at 30°C for 48 to 72 hours with shaking at 250 rpm. The cultures were centrifuged (4,200 rpm for 40 minutes) and the supernatants were incubated with STREAMLINE™-protein A beads (Amersham Biosciences, GE HEALTHCARE™, UK. Binding capacity: 5 mg of dAb per ml of beads), at 4°C or at room temperature for at least one hour. The beads were packed into a chromatography column and washed with PBS, followed by 10 mM Tris-HCl pH 7.4 (Sigma, UK). Bound dAbs were eluted with 0.1 M glycine-HCl pH 2.0 and neutralized with 1M Tris-HCL pH 8.0. The OD at 280 nm of the dAbs was measured and protein concentrations were determined using extinction coefficients calculated from the amino acid compositions of the dAbs. Affinity matured domain antibodies were tested on the BIACORE™ T200 (data for two preferred dAbs are shown in Example 9) and in the SBE-bla HEK 293T Cell Sensor assay (data for two preferred dAbs are shown in Example 11) to determine their affinity and potency. Biophysical properties including thermal stability and solution state were determined using Differential Scanning Colourimetry (DSC) and size exclusion chromatography with multi-angle-LASER-light scattering (SEC-MALS) (data for two preferred dAbs are shown in Example 10).

The amino acid and nucleic acid sequences of affinity matured DOM23h-439-20 and DOM23h-271-50 anti-human TGFRII dAbs

DOM23h-439-25 nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 233)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTG
TCTCACGTATTGATTCGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

DOM23h-439-25 amino acid sequence (SEQ ID NO: 234)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-271-123 nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 235)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC

GCGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGGCGCCCGGCGAGAAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCT
GGTCACCGTCTCGAGC

5 DOM23h-271-123 amino acid sequence (SEQ ID NO: 236)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-439-35 nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 237)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGATTACCTTTGGGACCGATCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCTACGCATTGATTCCCCCGGTGGGCGGACATACTAC
GCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACGGCAG
15 CCGGCGGGGGTGTCTGGGGAAGTACGTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC
TCGAGC

DOM23h-439-35 amino acid sequence (SEQ ID NO: 238)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTDQMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISR
20 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRQPAGVSGKYVDYWGQGLTVTVSS

DOM23h-271-129 nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 239)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCT
25 CCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGGCG
CCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGGCCGCTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTC
ACCGTCTCGAGC

30

DOM23h-271-129 amino acid sequence (SEQ ID NO: 240)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPNQRYVARGRLDYWGQGLTVTVSS

35 The CDRs as defined by Kabat of these anti-human TGFRII dAb affinity leads are shown in Table 13

Table 13. CDR Sequences of affinity matured anti-human TGF β RII dAbs

	CDR1 (Kabat 26-35)	CDR2 (Kabat 50-65)	CDR3 (Kabat 95-102)
DOM23h-271-123	GSTFTEYRMW (SEQ ID NO: 241)	AIEPIGHRYYADSVKG (SEQ ID NO: 242)	QAPGEKWARRWDL DY (SEQ ID NO: 243)
DOM23h-271-129	GSTFTEYRMW (SEQ ID NO: 244)	AIEPIGHRYYADSVKG (SEQ ID NO: 245)	QAPNQRYVARGRLDY (SEQ ID NO: 246)
DOM23h-439-25	GFTFGTEQMW (SEQ ID NO: 247)	RIDSPGGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 248)	RRPTGVSGTFYDY (SEQ ID NO: 249)
DOM23h-439-35	GFTFGTDQMW (SEQ ID NO: 250)	RIDSPGGRTYYANSVKG (SEQ ID NO: 251)	RQPAGVSGKYVDY (SEQ ID NO: 252)

Further Modification of the DOM23h-439-25 and DOM23h-271-123 nucleotide sequence

5 The D61N and K64R mutations as described in example 7 were introduced into the DOM23h-439-25, DOM23h-271-123 and DOM23h-271-129 affinity matured dAbs either in combination or separately. Introduction of a V48I mutation in the DOM23h-439-25 and DOM23h-271-123 dAbs was also tested to determine whether it could confer improvements in potency. Spontaneous mutation at kabat position 48 was observed in a number of improved dAbs from the DOM23h-439 lineage following

10 both test maturation and CDR-directed affinity maturation. An Alanine at the C-terminus of the Vh region, immediately after kabat residue 113 was also added to DOM23h-439-25, DOM23h-271-123 and DOM23h-271-129 and all variants of these dAbs with the afore-mentioned mutations. Mutations were introduced into the DOM23h-439-25 (SEQ ID NO: 234), DOM23h-271-123 (SEQ ID NO: 236) and DOM23h-271-129 (SEQ ID NO: 240) backbones by overlap extension using the polymerase

15 chain reaction (PCR) essentially as described in Example 7. Specific mutations in the nucleotide sequence were introduced by incorporating nucleotide changes into the overlapping oligonucleotide primers, the insertion of the Alanine at the end of the Vh region was achieved by using a 3' oligonucleotide designed to incorporate the Alanine residue after kabat position 113.

20 The following oligonucleotides were used to introduce the mutations (mutated residues underlined):

439 48I SDM F (SEQ ID NO: 253)

5'-GGGTCTAGAGTTTATTTCACGTATTGATTGCC-3'

25 439 61N SDM F (SEQ ID NO: 254)

5'-GGGAGGACATACTACGCAAACTCCGTGAAGGGCCGG-3'

439 64R SDM F (SEQ ID NO: 255)

5'-CGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

5 439 61N 64R SDM F (SEQ ID NO: 256)

5'-GGGAGGACATACTACGCAAACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

271 61N SDM F (SEQ ID NO: 257)

5'-GGACATACTACGCAAACTCCGTGAAGGGCCGG-3'

10

271 64R SDM F (SEQ ID NO: 258)

5'-CGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

271 61N 64R SDM F (SEQ ID NO: 259)

15 5'-GGACATACTACGCAAACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

567 +A rev (Flanks the 3' end of the dAb Vh gene)(SEQ ID NO: 260)

5'-CCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGTAATAAGCGGCCGCAGATTA-3'

20 21-23 Fwd (Flanks the 5' end of the dAb Vh gene)(SEQ ID NO: 261)

5'-ATAAGGCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG-3'

To determine the effect of the mutations the dAbs were expressed in TB ONEX™ supplemented with 100 ug/ml carbenicillin and antifoam (Sigma) at 30°C for 72 hours with shaking at 250 rpm. The cultures were centrifuged (4,200 rpm for 40 minutes) and dAbs affinity purified using STREAMLINE™-protein A beads (Amersham Biosciences, GE HEALTHCARE™, UK) as before. Affinity and potency of the domain antibody variants were determined on the BIACORE™ T200 (data for preferred dAbs is shown in Example 9) and in the SBE-bla HEK 293T Cell Sensor assay (data for preferred dAbs is shown in Example 11).

30

The amino acid and nucleic acid sequences of DOM23h-439-25 (SEQ ID NO: 234) and DOM23h-271-123 (SEQ ID NO: 236) anti-human TGFRII dAbs modified to include the C-terminal Alanine and D61N, K64R or V48I mutations are given below:

35 DOM23h-439-40 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 262)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTG
TCTCACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
5 GTGCGAAACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGCGCG

DOM23h-439-40 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 263)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSA

DOM23h-439-41 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine + 48I) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 264)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTA
TTTCACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
20 GTCTCGAGCGCG

DOM23h-439-41 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine + 48I) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 265)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFISRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN
25 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSA

DOM23h-439-42 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine + 61N) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 266)

30 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTG
TCTCACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGCGCG

35

DOM23h-439-42 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine + 61N) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 267)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSSA

5

DOM23h-439-43 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine + 64R) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 268)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTG
TCTCACGTATTGATTCGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGCGCG

15

DOM23h-439-43 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine + 64R) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 269)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVRGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSSA

20

DOM23h-439-44 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine + 61N64R) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 270)

25 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTG
TCTCACGTATTGATTCGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGCGCG

30 DOM23h-439-44 (DOM23h-439-25 + C-terminal Alanine + 61N64R) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 271)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYANSVRGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSSA

35 DOM23h-271-130 (DOM23h-271-123 + C-terminal Alanine) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 272)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
 CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
 TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
 5 GTGCGAAACAGGCGCCCGGCGAGAAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCT
 GGTCACCGTCTCGAGCGCG

DOM23h-271-130 (DOM23h-271-123 + C-terminal Alanine) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 273)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYADSVKGRFTISR
 D
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDL DYWGQGLTVTVSSA

DOM23h-271-131 (DOM23h-271-123 + C-terminal Alanine + 61N) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 274)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
 CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
 TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
 GTGCGAAACAGGCGCCCGGCGAGAAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCT
 20 GGTCACCGTCTCGAGCGCG

DOM23h-271-131 (DOM23h-271-123 + C-terminal Alanine + 61N) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 275)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYANSVKGRFTISR
 D
 25 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDL DYWGQGLTVTVSSA

DOM23h-271-132 (DOM23h-271-123 + C-terminal Alanine + 64R) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 276)

30 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
 CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
 TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACCATCTCCC
 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
 GTGCGAAACAGGCGCCCGGCGAGAAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCT
 GGTCACCGTCTCGAGCGCG

35

DOM23h-271-132 (DOM23h-271-123 + C-terminal Alanine + 64R) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 277)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYADSVRGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVTVSSA

5

DOM23h-271-133 (DOM23h-271-123+ C-terminal Alanine + 61N64R) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 278)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
10 TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACTCCGTGCGTGGCCGGTTACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGGCGCCCGGCGAGAAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCT
GGTCACCGTCTCGAGC GCG

15 DOM23h-271-133 (DOM23h-271-123+ C-terminal Alanine + 61N64R) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 279)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYANSVRGRFTISRDN
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVTVSSA

20 DOM23h-271-134 (DOM23h-271-123+ C-terminal Alanine + 48I) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 280)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGA
TTTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCC
25 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGGCGCCCGGCGAGAAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCT
GGTCACCGTCTCGAGCGCG

30 DOM23h-271-134 (DOM23h-271-123+ C-terminal Alanine + 48I) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 281)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWISAIEPIGHRITYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVTVSSA

DOM23h-271-135 (DOM23h-271-129 + C-terminal Alanine) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 282)

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG

TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCC GGGGCCGCTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGCGCG

5

DOM23h-271-135 (DOM23h-271-129 + C-terminal Alanine) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 283)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPNQRYVARGRLDYWGQGLTVTVSSA

10 DOM23h-271-136 (DOM23h-271-129 + C-terminal Alanine + 61N) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 284)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
15 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCC GGGGCCGCTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGCGCG

20 DOM23h-271-136 (DOM23h-271-129 + C-terminal Alanine + 61N) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 285)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYANSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPNQRYVARGRLDYWGQGLTVTVSSA

25 DOM23h-271-137 (DOM23h-271-129 + C-terminal Alanine + 61N64R) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 286)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGG
TCTCAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGCCGCGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACT
30 GTGCGAAACAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCC GGGGCCGCTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGCGCG

35 DOM23h-271-137 (DOM23h-271-129 + C-terminal Alanine + 61N64R) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 287)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYYANSVRGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPNQRYVARGRLDYWGQGLTVTVSSA

DOM23h-439-47 (DOM23h-439-42 + 48I) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 288)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
CTCCGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTA
TTTCACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCC
5 GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGCGCG

DOM23h-439-47 (DOM23h-439-42 + 48I) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 289)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFISRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSSA

DOM23h-439-48 (DOM23h-439-44 + 48I) Nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 290)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGC
15 CTCCGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTA
TTTCACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGGCCGGTTCACCATCTCCC
GCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGCGCG

20

DOM23h-439-48 (DOM23h-439-44 + 48I) Amino acid sequence (SEQ ID NO: 291)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFISRIDSPGGRTYYANSVRGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSSA

25

Example 9. Biacore kinetic analysis of affinity matured domain antibodies

Anti-human IgG was immobilised on a Biacore CM4 chip by primary amine coupling according to the manufacturer's instructions. Human TGF- β RII/Fc, cynomolgus TGF- β RII/Fc or human Fc fragment were captured on this surface. Domain antibodies were passed over the two captured receptors at 3
30 concentrations of 100, 10 and 1 nM (DOM23h-439 dAbs) or 100, 25 and 6.25 nM (DOM23h-271 dAbs). Only the 100 nM concentration of each dab was passed over human Fc fragment to confirm specificity of binding to the extracellular TGF- β RII domain. An injection of buffer over the captured antigen surface was used for double referencing. The captured surface was regenerated, after each domain antibody injection using 3M magnesium chloride solution; the regeneration removed the
35 captured antigen but did not significantly affect the ability of the surface to capture antigen in a subsequent cycle. All runs were carried out at 25°C using HBS-EP buffer as running buffer. Data

were generated using the BIACORE™ T200 and fitted to the 1:1 binding model inherent to the software. Table 14 shows the binding kinetics of the dAbs tested. The DOM23h-271 dAbs and the DOM23h-439 lineages were run in separate experiments.

5 Table 14

	Human TGFBRII			Cyno TGFBRII		
sample	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (M)	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (M)
DOM23h-271-123	2.89E+06	2.93E-04	1.02E-10	3.08E+06	3.20E-04	1.04E-10
DOM23h-271-129	5.55E+06	4.11E-04	7.41E-11	6.00E+06	4.27E-04	7.12E-11
DOM23h-271-130	2.51E+06	3.09E-04	1.23E-10	2.61E+06	3.24E-04	1.24E-10
DOM23h-271-131	6.26E+06	1.36E-04	2.17E-11	6.81E+06	1.44E-04	2.12E-11
DOM23h-271-132	1.22E+07	2.22E-04	1.82E-11	1.29E+07	2.38E-04	1.85E-11
DOM23h-271-133	8.47E+06	7.70E-05	9.09E-12	8.84E+06	8.71E-05	9.85E-12
DOM23h-439-25	7.77E+06	6.34E-04	8.17E-11	8.99E+06	2.73E-03	3.04E-10
DOM23h-439-35	2.26E+07	2.22E-04	9.83E-12	2.32E+07	6.75E-04	2.91E-11
DOM23h-439-40	1.34E+07	1.39E-03	1.04E-10	9.34E+06	3.42E-03	3.66E-10
DOM23h-439-41	1.81E+07	1.87E-04	1.04E-11	1.57E+07	5.22E-04	3.33E-11
DOM23h-439-42	4.09E+07	1.31E-04	3.20E-12	3.72E+07	4.10E-04	1.10E-11
DOM23h-439-43	8.83E+06	3.73E-04	4.23E-11	8.04E+06	1.20E-03	1.49E-10

DOM23h-439-44	2.39E+07	6.91E-05	2.89E-12	2.17E+07	1.47E-04	6.77E-12
---------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Example 10. Biophysical Evaluation of affinity matured dAbs

The thermal stability of the dAbs was determined using Differential Scanning Calorimeter (DSC). dAbs were dialysed overnight into PBS buffer and adjusted at a final concentration of 1mg/ml.

- 5 Dialysis buffer was used as a reference for all samples. DSC was performed using capillary cell microcalorimeter VP-DSC (GE healthcare / Microcal), at a heating rate of 180°C/hour. A typical scan range was from 20-90°C for both the reference buffer and the protein sample. After each reference buffer and sample pair, the capillary cell was cleaned with a solution of 5% Decon (Fisher-Scientific) in water followed by PBS. Resulting data traces were analyzed using Origin 7.0 software. The DSC
- 10 trace obtained from the reference buffer was subtracted from the sample trace. The precise molar concentration of the sample was entered into the data analysis routine to yield values for melting temperature (T_m), enthalpy (ΔH) and Van't Hoff enthalpy (ΔH_v) values. Data were fitted to a non-2-state model. Best fit and dependence values were obtained with either 1 or 2 transition events. On-set unfolding temperature was also determined by integrating from zero each sample thermogram.
- 15 This value was then determined as the temperature at which 4 percentage of the sample was unfolded.

Table 14A

Protein name	Apparent T_m (C)	On-set temperature (C)
DOM23h-439-21	60.66	52.5
DOM23h-439-25	56.34	49
DOM23h-439-30	57.17	50
DOM23h-439-32	55.01	49
DOM23h-439-33	58.93	51
DOM23h-439-34	56.78	50
DOM23h-855-42	61.90	55
DOM23h-855-43	66.81	58.6
DOM23h-855-44	63.38	56

DOM23h-271-123	54.82	50.6
DOM23h-271-124	58.16	52
DOM23h-271-125	58.26	55

Analysis of solution state by size exclusion chromatography with multi-angle-LASER-light scattering (SEC-MALS)

5 To determine whether dAbs are monomeric or form higher order oligomers in solution, they were analyzed by SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle-LASER-Light-Scattering). Agilent 1100 series HPLC system with an autosampler and a UV detector (controlled by Empower software) was connected to Wyatt Mini Dawn Treos (Laser Light Scattering (LS) detector) and Wyatt Optilab rEX DRI (Differential Refractive Index (RI) detector). The detectors are connected in the

10 following order -UV-LS-RI. Both RI and LS instruments operate at a wavelength of 658nm; the UV signal is monitored at 280nm and 220nm. Domain antibodies (50 microliters injection at a concentration of 1mg/mL in PBS) were separated according to their hydrodynamic properties by size exclusion chromatography using a TSK2000 column. The mobile phase was 0.2M NaCl, 0.1M NaPO₄, 15% n-propanol. The intensity of the scattered light while protein passed through the detector was

15 measured as a function of angle. This measurement taken together with the protein concentration determined using the RI detector allowed calculation of the molar mass using appropriate equations (integral part of the analysis software Astra v.5.3.4.14). The solution state as percentage monomer is shown in Table 15.

20 Table 15

	Percentage monomer
DOM23h-439-21	100%
DOM23h-439-25	100%
DOM23h-439-30	100%
DOM23h-439-32	100%
DOM23h-439-33	98.2%
DOM23h-439-34	97.7%
DOM23h-855-42	83.8%
DOM23h-855-43	83%
DOM23h-855-44	64.7%

DOM23h-271-123	100%
DOM23h-271-124	97.4%

Example 11. TGF β -RII inhibition by affinity matured dAbs in the SBE-bla HEK 293T Cell Sensor assay

5 The assay was carried out exactly as outlined in example 4, assay h2.

The assay was performed multiple times to obtain an average and a range of values which are summarised in Table 16. The arithmetic mean IC₅₀ was calculated using log IC₅₀s, and the range was calculated by adding and subtracting the log standard deviation from the mean IC₅₀, and then transforming back to IC₅₀. The assay QC parameters were met; the robust Z factors were
10 greater than 0.4 and the TGF- β EC₈₀ was within 6 fold of the concentration added to the assay. The results are shown in Table 16.

Table 16 Cell Functional assay data for human specific clones plus VH Dummy dAb.

15

	IC ₅₀ nM		
	Mean	IC ₅₀ range (+/- log SD)	n
DOM23h-271-123	18.3	9.8 - 34.1	11
DOM23h-271-129	22.7	16.6 - 31.1	4
DOM23h-271-130	37.0	15.1 - 90.7	4
DOM23h-271-131	6.3	4.5 - 8.9	4
DOM23h-271-132	21.0	16.1 - 27.5	4
DOM23h-271-133	2.4	1.5 - 3.8	4
DOM23h-439-25	4.0	1.1 - 14.7	17
DOM23h-439-35	0.5	0.4 - 0.7	3
DOM23h-439-37	0.7	0.2 - 2.2	4
DOM23h-439-40	14	10.8 - 18.8	6
DOM23h-439-41	1.7	1.3 - 2.3	4
DOM23h-439-42	0.7	0.2 - 2.7	8
DOM23h-439-43	1.0	0.7 - 1.4	4
DOM23h-439-44	1.3	0.5 - 3.3	6
VHDummy2	> 25119	25119	13

Sequence Concordance Table

SEQ ID NO	DOM number	Description
1	DOM23h-802	amino acid sequence – naive clone
2	DOM23h-803	amino acid sequence – naive clone
3	DOM23h-813	amino acid sequence – naive clone
4	DOM23h-815	amino acid sequence – naive clone
5	DOM23h-828	amino acid sequence – naive clone
6	DOM23h-830	amino acid sequence – naive clone
7	DOM23h-831	amino acid sequence – naive clone
8	DOM23h-840	amino acid sequence – naive clone
9	DOM23h-842	amino acid sequence – naive clone
10	DOM23h-843	amino acid sequence – naive clone
11	DOM23h-850	amino acid sequence – naive clone
12	DOM23h-854	amino acid sequence – naive clone
13	DOM23h-855	amino acid sequence – naive clone
14	DOM23h-865	amino acid sequence – naive clone
15	DOM23h-866	amino acid sequence – naive clone
16	DOM23h-874	amino acid sequence – naive clone
17	DOM23h-883	amino acid sequence – naive clone
18	DOM23h-903	amino acid sequence – naive clone
19	DOM23m-4	amino acid sequence – naive clone
20	DOM23m-29	amino acid sequence – naive clone
21	DOM23m-32	amino acid sequence – naive clone
22	DOM23m-62	amino acid sequence – naive clone
23	DOM23m-71	amino acid sequence – naive clone
24	DOM23m-72	amino acid sequence – naive clone
25	DOM23m-81	amino acid sequence – naive clone
26	DOM23m-99	amino acid sequence – naive clone
27	DOM23m-101	amino acid sequence – naive clone
28	DOM23m-352	amino acid sequence – naive clone
29	DOM23h-271-21	amino acid sequence – affinity matured
30	DOM23h-271-22	amino acid sequence – affinity matured
31	DOM23h-271-27	amino acid sequence – affinity matured
32	DOM23h-271-101	amino acid sequence – affinity matured
33	DOM23h-271-102	amino acid sequence – affinity matured
34	DOM23h-271-105	amino acid sequence – affinity matured
35	DOM23h-271-106	amino acid sequence – affinity matured
36	DOM23h-271-114	amino acid sequence – affinity matured
37	DOM23h-271-39	amino acid sequence – affinity matured plus D61R K64D mutation
38	DOM23h-271-40	amino acid sequence – affinity matured plus D61R K64F mutation
39	DOM23h-802	nucleic acid sequence – naive clone
40	DOM23h-803	nucleic acid sequence – naive clone
41	DOM23h-813	nucleic acid sequence – naive clone
42	DOM23h-815	nucleic acid sequence – naive clone
43	DOM23h-828	nucleic acid sequence – naive clone

44	DOM23h-830	nucleic acid sequence – naive clone
45	DOM23h-831	nucleic acid sequence – naive clone
46	DOM23h-840	nucleic acid sequence – naive clone
47	DOM23h-842	nucleic acid sequence – naive clone
48	DOM23h-843	nucleic acid sequence – naive clone
49	DOM23h-850	nucleic acid sequence – naive clone
50	DOM23h-854	nucleic acid sequence – naive clone
51	DOM23h-855	nucleic acid sequence – naive clone
52	DOM23h-865	nucleic acid sequence – naive clone
53	DOM23h-866	nucleic acid sequence – naive clone
54	DOM23h-874	nucleic acid sequence – naive clone
55	DOM23h-883	nucleic acid sequence – naive clone
56	DOM23h-903	nucleic acid sequence – naive clone
57	DOM23m-4	nucleic acid sequence – naive clone
58	DOM23m-29	nucleic acid sequence – naive clone
59	DOM23m-32	nucleic acid sequence – naive clone
60	DOM23m-62	nucleic acid sequence – naive clone
61	DOM23m-71	nucleic acid sequence – naive clone
62	DOM23m-72	nucleic acid sequence – naive clone
63	DOM23m-81	nucleic acid sequence – naive clone
64	DOM23m-99	nucleic acid sequence – naive clone
65	DOM23m-101	nucleic acid sequence – naive clone
66	DOM23m-352	nucleic acid sequence – naive clone
67	DOM23h-271-21	nucleic acid sequence – affinity matured
68	DOM23h-271-22	nucleic acid sequence – affinity matured
69	DOM23h-271-27	nucleic acid sequence – affinity matured
70	DOM23h-271-101	nucleic acid sequence – affinity matured
71	DOM23h-271-102	nucleic acid sequence – affinity matured
72	DOM23h-271-105	nucleic acid sequence – affinity matured
73	DOM23h-271-106	nucleic acid sequence – affinity matured
74	DOM23h-271-114	nucleic acid sequence – affinity matured
75	DOM23h-271-39	nucleic acid sequence – affinity matured plus D61R K64D mutation
76	DOM23h-271-40	nucleic acid sequence – affinity matured plus D61R K64F mutation
77	DOM23h-802	CDR1
113	..	CDR2
149	..	CDR3
78	DOM23h-803	CDR1
114	..	CDR2
150	..	CDR3
79	DOM23h-813	CDR1
115	..	CDR2
151	..	CDR3
80	DOM23h-815	CDR1
116	..	CDR2
152	..	CDR3
81	DOM23h-828	CDR1
117	..	CDR2
153	..	CDR3

82	DOM23h-830	CDR1
118	..	CDR2
154	..	CDR3
83	DOM23h-831	CDR1
119	..	CDR2
155	..	CDR3
84	DOM23h-840	CDR1
120	..	CDR2
156	..	CDR3
85	DOM23h-842	CDR1
121	..	CDR2
157	..	CDR3
86	DOM23h-843	CDR1
122	..	CDR2
158	..	CDR3
87	DOM23h-850	CDR1
123	..	CDR2
159	..	CDR3
88	DOM23h-854	CDR1
124	..	CDR2
160	..	CDR3
89	DOM23h-855	CDR1
125	..	CDR2
161	..	CDR3
90	DOM23h-865	CDR1
126	..	CDR2
162	..	CDR3
91	DOM23h-866	CDR1
127	..	CDR2
163	..	CDR3
92	DOM23h-874	CDR1
128	..	CDR2
164	..	CDR3
93	DOM23h-883	CDR1
129	..	CDR2
165	..	CDR3
94	DOM23h-903	CDR1
130	..	CDR2
166	..	CDR3
95	DOM23m-4	CDR1
131	..	CDR2
167	..	CDR3
96	DOM23m-29	CDR1
132	..	CDR2
168	..	CDR3
97	DOM23m-32	CDR1
133	..	CDR2
169	..	CDR3
98	DOM23m-62	CDR1
134	..	CDR2
170	..	CDR3

99	DOM23m-71	CDR1
135	..	CDR2
171	..	CDR3
100	DOM23m-72	CDR1
136	..	CDR2
172	..	CDR3
101	DOM23m-81	CDR1
137	..	CDR2
173	..	CDR3
102	DOM23m-99	CDR1
138	..	CDR2
174	..	CDR3
103	DOM23m-101	CDR1
139	..	CDR2
175	..	CDR3
104	DOM23m-352	CDR1
140	..	CDR2
176	..	CDR3
105	DOM23h-271-21	CDR1
141	..	CDR2
177	..	CDR3
106	DOM23h-271-22	CDR1
142	..	CDR2
178	..	CDR3
107	DOM23h-271-27	CDR1
143	..	CDR2
179	..	CDR3
108	DOM23h-271-101	CDR1
144	..	CDR2
180	..	CDR3
109	DOM23h-271-102	CDR1
145	..	CDR2
181	..	CDR3
110	DOM23h-271-105	CDR1
146	..	CDR2
182	..	CDR3
111	DOM23h-271-106	CDR1
147	..	CDR2
183	..	CDR3
112	DOM23h-271-114	CDR1
148	..	CDR2
184	..	CDR3
185	DOM008	primer
186	DOM009	primer
187	DOM172	primer
188	DOM173	primer
189	271-7R1deg CDR1	primer
190	271-7R2deg CDR2	primer
191	271-7R3deg CDR3	primer
192	PE008	primer

193	271-6164 R	primer
194	271-6164 deg-F	primer
195	AS1309	primer
196	271-6164 NR-F	primer
197	DOM57	primer
198	DOM6	primer
199	DOM23h-271	amino acid sequence – naive clone
200	DOM23h-271	nucleic acid sequence – naive clone
201	DOM23h-271-7	amino acid sequence – naive clone
202	DOM23h-271-7	nucleic acid sequence – naive clone
203	DOM23h-855-21	nucleic acid sequence – test matured clone
204	DOM23h-855-21	amino acid sequence – test matured clone
205	DOM23h-843-13	nucleic acid sequence – test matured clone
206	DOM23h-843-13	amino acid sequence – test matured clone
207	DOM23h-439-20	nucleic acid sequence – test matured clone
208	DOM23h-439-20	amino acid sequence – test matured clone
209	PEP-26-F	Primer
210	PeIB NcoVh	Primer
211	PEP011	Primer
212	DOM-271-50	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
213	DOM-271-50	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
214	DOM-271-50	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone (*duplicate of 213 above*)
215	PEP044	Primer
216	23h-439-20 CDRH1	Primer
217	23h-439-20 CDRH2	Primer
218	23h-439-20 CDRH3	Primer
219	23h-843-13 CDRH1	Primer
220	23h-843-13 CDRH2	Primer
221	23h-843-13 CDRH3	Primer
222	23h-855-21 CDRH1	Primer
223	23h-855-21 CDRH2	Primer
224	23h-855-21 CDRH3	Primer
225	H1-271-43 R	Primer
226	H2p1-271-43F	Primer
227	H2p2-271-43 F	Primer
228	H3p1-271-43 F	Primer
229	H3p2-271-43 F	Primer
230	H3p3-271-43 F	Primer
231	PEP011VHStopNotIR	Primer

232	Nco1 VH F	Primer
233	DOM23h-439-25	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
234	DOM23h-439-25	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
235	DOM23h-271-123	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
236	DOM23h-271-123	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
237	DOM23h-439-35	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
238	DOM23h-439-35	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
239	DOM23h-271-129	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
240	DOM23h-271-129	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
241	DOM23h-271-123	CDR1
242	DOM23h-271-123	CDR2
243	DOM23h-271-123	CDR3
244	DOM23h-271-129	CDR1
245	DOM23h-271-129	CDR2
246	DOM23h-271-129	CDR3
247	DOM23h-439-25	CDR1
248	DOM23h-439-25	CDR2
249	DOM23h-439-25	CDR3
250	DOM23h-439-35	CDR1
251	DOM23h-439-35	CDR2
252	DOM23h-439-35	CDR3
253	439 48I SDM F	Primer
254	439 61N SDM F	Primer
255	439 64R SDM F	Primer
256	439 61N 64R SDM F	Primer
257	271 61N SDM F	Primer
258	271 64R SDM F	Primer
259	271 61N 64R SDM F	Primer
260	567 +A rev	Primer
261	21-23 Fwd	Primer
262	DOM23h-439-40	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
263	DOM23h-439-40	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
264	DOM23h-439-41	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
265	DOM23h-439-41	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
266	DOM23h-439-42	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
267	DOM23h-439-42	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
268	DOM23h-439-43	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
269	DOM23h-439-43	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
270	DOM23h-439-44	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
271	DOM23h-439-44	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
272	DOM23h-271-130	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
273	DOM23h-271-130	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
274	DOM23h-271-131	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
275	DOM23h-271-131	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
276	DOM23h-271-132	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone

277	DOM23h-271-132	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
278	DOM23h-271-133	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
279	DOM23h-271-133	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
280	DOM23h-271-134	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
281	DOM23h-271-134	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
282	DOM23h-271-135	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
283	DOM23h-271-135	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
284	DOM23h-271-136	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
285	DOM23h-271-136	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
286	DOM23h-271-137	nucleic acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
287	DOM23h-271-137	amino acid sequence – CDR-directed affinity matured clone
288	DOM23h-439-47	nucleic acid sequence - DOM23h-439-42 + 48I
289	DOM23h-439-47	amino acid sequence - DOM23h-439-42 + 48I
290	DOM23h-439-48	nucleic acid sequence - DOM23h-439-44 + 48I
291	DOM23h-439-48	amino acid sequence - DOM23h-439-44 + 48I

Claims

1. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain comprising an amino acid sequence as set forth in any one of SEQ ID NO:1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 and 291, having up to 5 amino acid substitutions, deletions or additions, in any combination.
2. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in claim 1, comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 234 or 236, having up to 5 amino acid substitutions, deletions or additions, in any combination.
3. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in claim 1 or claim 2, wherein the said amino acid substitutions, deletions or additions are not within CDR3.
4. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in claim 1, 2 or 3, wherein the said amino acid substitutions, deletions or additions are not within any of the CDRs.
5. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain comprising of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 and 291.
6. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in claim 5 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 234 or 236.
7. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in any one of the preceding claims, wherein the anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain further comprises a C-terminal alanine residue.
8. An isolated polypeptide comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in any one of the preceding claims, wherein said isolated polypeptide binds to TGFbetaRII.
9. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in any of claims 1-7, or a polypeptide as claimed in claim 8, further comprising at least one of the following amino acids selected from the group: R at position 39, I at position 48, D at position 53, N at position 61, R at position 61, K at position 61, R at position 64, F at position 64, D at position 64, E at position 64, M at position 64, Y at position 64, H at position 102, or S at position 103 of the immunoglobulin single variable domain, said positions being according to the kabat numbering convention.
10. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or a polypeptide as claimed in claim 9, comprising an R or a K at position 61.
11. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in any of claims 1-7, or a polypeptide as claimed in claim 8, further comprising one of the following amino acid combinations selected from the group: N at position 61 and R at position 64; R at position 61 and E at position 64; R at position 61 and M at position 64; R at position 61 and F at position

64; R at position 61 and Y at position 64; and R at position 61 and D at position 64 of the immunoglobulin single variable domain.

12. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or a polypeptide as claimed in claim 9, 10 or 11, comprising an isoleucine residue at position 48.

5 13. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-12, wherein said anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or polypeptide binds to human TGFbetaRII.

14. An anti-TGFbeta RII immunoglobulin single variable domain or polypeptide as claimed in claim 13, wherein said anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or polypeptide also
10 binds to mouse TGFbetaRII and/or cyno TGFbetaRII.

15. An immunoglobulin single variable domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-14, wherein said immunoglobulin single variable domain or polypeptide neutralises TGFbeta activity.

16. An immunoglobulin single variable domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-15, wherein said immunoglobulin single variable domain or polypeptide inhibits binding of TGFbeta
15 to TGFbetaRII.

17. An isolated nucleic acid encoding an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-16.

18. An isolated nucleic acid molecule as claimed in claim 16, comprising at least one nucleic acid molecule selected from the group of: SEQ ID NOs: 39-76, 203, 205, 207, 212, 233, 235, 237,
20 239, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290.

19. A vector comprising a nucleic acid molecule as claimed in claim 17 or claim 18.

20. A host cell comprising a nucleic acid or a vector as claimed in any one of claims 17-19.

21. A method of producing a polypeptide comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in any one of claims 1-16, the method comprising maintaining a
25 host cell as claimed in claim 20 under conditions suitable for expression of said nucleic acid or vector, whereby a polypeptide comprising an immunoglobulin single variable is produced.

22. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-16 for use as a medicament.

23. A pharmaceutical composition comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable
30 domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-16.

24. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or polypeptide as claimed in claim 22 or pharmaceutical composition as claimed in claim 23 for treatment of a disease associated with TGFbeta signaling.

25. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide or pharmaceutical
35 composition as claimed in claim 24, wherein the disease associated with TGFbeta signalling is selected from the group of: tissue fibrosis, such as pulmonary fibrosis, including idiopathic pulmonary fibrosis; liver fibrosis, including cirrhosis and chronic hepatitis; rheumatoid arthritis; ocular disorders; fibrosis of the skin, including keloid of skin, and Dupuytren's Contracture;

kidney fibrosis such as nephritis and nephrosclerosis, wound healing; and a vascular condition, such as restenosis.

26. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain, polypeptide or pharmaceutical composition as claimed in claim 22, for use in treating tissue fibrosis or for use in wound healing and/or scarring reduction.
27. An anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain as claimed in claim 22, 24 or 25, wherein the disease is keloid disease or Dupuytren's Contracture.
28. Use of an anti-TGFbetaRII single variable domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-16 in the manufacture of a medicament for the treatment of a disease associated with TGFbeta signaling.
29. A method of treating and/or preventing a TGFbeta-mediated condition in a human patient, the method comprising the step of: administering a composition comprising an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-16 to the human patient.
30. A kit comprising an anti-TGFbetaRII single variable domain or polypeptide as claimed in any one of claims 1-16 and a device for applying said single variable domain or polypeptide to the skin.
31. A kit as claimed in claim 30, wherein the device is an intradermal delivery device.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/050061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2011/012609 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; DE WILDT RUDOLF MARIA [GB]; DIMECH CAROLINE J [G] 3 February 2011 (2011-02-03) sequences 4,15,17 sequences 10,22,23 -----	1-31
X	WO 2010/053814 A1 (IMCLONE LLC [US]; WU YAN [US]) 14 May 2010 (2010-05-14) table 3 page 23, line 2 page 24 - page 28 -----	1-31
A	EP 1 245 676 A1 (JAPAN TOBACCO INC [JP] AMGEN FREMONT INC [US]) 2 October 2002 (2002-10-02) claims 1-2 paragraph [0089] ----- -/--	1-31



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 2012

Date of mailing of the international search report

21/03/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/050061

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WESOŁOWSKI JANUSZ ET AL: "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity", MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 198, no. 3, 16 June 2009 (2009-06-16) , pages 157-174, XP002610389, ISSN: 1432-1831, DOI: 10.1007/S00430-009-0116-7 the whole document -----	1-31
A	DEMAREST STEPHEN J ET AL: "Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 11, no. 5, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 675-687, XP008108499, ISSN: 1367-6733 the whole document -----	1-31
A	SAERENS DIRK ET AL: "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 8, no. 5, 1 October 2008 (2008-10-01) , pages 600-608, XP002610390, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2008.07.006 [retrieved on 2008-08-22] the whole document -----	1-31
A	CHEN W ET AL: "Construction of a large phage-displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 382, no. 3, 10 October 2008 (2008-10-10), pages 779-789, XP002610391, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2008.07.054 [retrieved on 2008-07-26] the whole document -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/050061

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)
☐ on paper
☒ in electronic form
 - b. (time)
☐ in the international application as filed
☒ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/050061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011012609	A2	03-02-2011	NONE
WO 2010053814	A1	14-05-2010	AR 073909 A1 09-12-2010
		AU 2009311375 A1 14-05-2010	
		CA 2742961 A1 14-05-2010	
		CN 102209727 A 05-10-2011	
		EA 201170659 A1 31-10-2011	
		EP 2356152 A1 17-08-2011	
		KR 20110067155 A 21-06-2011	
		PA 8846101 A1 28-06-2010	
		TW 201026326 A 16-07-2010	
		US 2010119516 A1 13-05-2010	
		WO 2010053814 A1 14-05-2010	
EP 1245676	A1	02-10-2002	AT 408628 T 15-10-2008
		AU 779871 B2 17-02-2005	
		AU 1415801 A 30-05-2001	
		AU 2005200044 A1 03-02-2005	
		CA 2389862 A1 25-05-2001	
		EP 1245676 A1 02-10-2002	
		ES 2313908 T3 16-03-2009	
		JP 2001206899 A 31-07-2001	
		US 7579186 B1 25-08-2009	
		WO 0136642 A1 25-05-2001	

**LIGANDOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR II DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-BETA**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

El factor de crecimiento transformante- β (TGFbeta; TGF β (TGF- β), es una molécula de señalización que media la transducción de señales en las células a través de la unión a un receptor del TGFbeta (TGFbetaR; TGF β R (TGF- β R)). La actividad de señalización del TGFbeta regula la diferenciación y el crecimiento celular, y la naturaleza de su efecto, es decir, como promotor del crecimiento celular, supresor del crecimiento o inductor de otras funciones celulares, siendo dependiente del tipo de célula (véase Roberts, *et al.*, The transforming growth factor-betas, Peptide Growth Factors and Their Receptors, parte I, ed. por Sporn, M. B. y Roberts, A. B., Springer-Verlag, Berlín, 1990, p. 419-472).

10
15

El TGFbeta es producido por una amplia variedad de tipos de células, y sus receptores cognados son expresados en una amplia variedad de órganos y células (véase Shi y Massague, Cell, volumen 113, emisión 6, 13 de junio de 2003, páginas 685-700; Biol. Signals., Vol. 5, p. 232, 1996 y Pulmonary Fibrosis, Vol. 80 de la serie Lung Biology in Health and Disease, ed. por Phan, *et al.*, p. 627, Dekker, New York, 1995). Se ha identificado que los receptores del TGFbeta pertenecen a tres tipos: TGFbetaRI (TGF β RI) (receptor del TGFbeta tipo I (Franzen *et al.*, Cell, Vol. 75, No. 4, p. 681, 1993;

20

No. de acceso del Genbank: L11695)); TGFbetaRII (TGFβRII) (receptor del TGFbeta tipo II (Herbert *et al.*, Cell, Vol. 68, No. 4, p. 775, 1992; No. de acceso del Genbank: M85079)) y TGFbetaRIII (receptor del TGFbeta tipo III (López-Casillas, Cell, Vol. 67, No. 4, p. 785, 1991; No. de acceso del Genbank: L07594)). Se ha mostrado que el TGFbetaRI y el TGFbetaRII son
 5 esenciales para la transducción de señales del TGF-beta (Laiho *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 265, p. 18518, 1990 y Laiho *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 266, p. 9108, 1991), mientras que no se piensa que el TGFbetaRIII sea esencial.

La señalización del TGFbeta es mediada a través de su unión al
 10 TGFbetaRI y RII. Cuando el ligando se une al dominio de unión del ligando extracelular, los dos receptores se reúnen, permitiendo que RII fosforile a RI y comience la cascada de señalización a través de la fosforilación de las proteínas Smad (véase Shi y Massague, citas referidas anteriormente).

Se han identificado tres isoformas del TGFbeta en mamíferos:
 15 TGFbeta1, TGFbeta2 y TGFbeta3. Cada isoforma es multifuncional y actúa en mecanismos de retroalimentación autorreguladores que controlan la biodisponibilidad para los procesos del desarrollo y mantienen la homeostasis de los tejidos (según se revisa en ten Dijke y Arthur, Nature Reviews, Molecular Cell Biology, Vol. 8, Nov. 2007, p. 857-869). Los niveles del
 20 TGFbeta son controlados por regulación a través de la expresión del TGFbeta, así como a través de la unión al proteoglucano, es decir, la matriz extracelular (ECM).

La señalización disregulada del TGFbeta, tal como el exceso de

señalización del TGFbeta y los altos niveles del TGFbeta biodisponible, está implicada en muchas patologías, que incluyen la fibrosis de varios tejidos, tales como la fibrosis y cirrosis pulmonar, hepatitis crónica, artritis reumatoide, trastornos oculares, restenosis vascular, queloide de la piel, y el inicio de
5 nefrosclerosis.

Por consiguiente, existe la necesidad de proveer compuestos que bloqueen o alteren la señalización del TGFbeta en una manera específica, tal como a través de la unión al receptor II del TGFbeta. Dichos compuestos pueden usarse en terapéutica.
10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La descripción se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII. Convenientemente, un dominio variable
15 individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la descripción, es uno que se une al TGFbetaRII con una constante de disociación (KD) en equilibrio en la escala de 10 pM a 50 nM, opcionalmente 10 pM a 10 nM, opcionalmente 100 pM a 10 nM. En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII es uno que se
20 une al TGFbetaRII con alta afinidad (alta potencia), y tiene una constante de disociación en equilibrio de 10 pM a 500 pM. En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII es uno que se une al TGFbetaRII con una afinidad (KD) de aproximadamente 100 pM. En una

modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII es uno que se une al TGFbetaRII con una afinidad (KD) menor de 100 pM. En otra modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII es uno que se une al TGFbetaRII con afinidad moderada (baja potencia), y tiene una constante de disociación en equilibrio de 500 pM a 50 nM, de preferencia de 500 pM a 10 nM. En otro aspecto, la descripción provee un polipéptido aislado que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII. Convenientemente, el polipéptido aislado se une al TGFbetaRII de humano. En otra modalidad, el polipéptido aislado se une también al TGFbetaRII derivado de una especie diferente tal como ratón, perro o monos, tales como monos *Cynomolgus* (*cyno*). Convenientemente, el polipéptido aislado se une al TGFbetaRII de humano y de ratón. Dicha reactividad cruzada entre el TGFbetaRII de humanos y otras especies, permite que la misma construcción de anticuerpo se use en un modelo de enfermedad en animales, así como en humanos.

En un aspecto de la descripción, se provee un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 y 287, y que tiene hasta 5 alteraciones de aminoácido, en donde cada alteración de aminoácido es una sustitución, delección o adición de aminoácido, es decir, hasta 5 sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácido, en cualquier combinación. En una modalidad particular, las

sustituciones de aminoácido son sustituciones conservativas.

En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 234 o 279, y tiene hasta 5 alteraciones de aminoácido, en donde cada alteración de aminoácido es una sustitución, delección o adición de aminoácido. En una modalidad particular, las alteraciones de aminoácido no están dentro de la CDR3, más específicamente no dentro de la CDR3 y CDR1, o la CDR3 y CDR2, más específicamente no dentro de cualquiera de las CDRs. En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII consiste de cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 y 287. En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 234 o 236.

No se pretende abarcar cualquier secuencia específica del dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII descrita en el documento WO 2011012609. Para que no haya duda, cada una y cualquier secuencia descrita en el documento WO 2011012609 puede ser rechazada de la presente invención. En particular, pueden rechazarse DOM23h-271 (SEQ ID NO: 4) y DOM-23h-439 (SEQ ID NO: 10) como se describe en el documento WO 2011012609. Puede rechazarse un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que consista de la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 199 o 201.

Un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la invención, puede comprender uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) residuos de alanina C-terminales. En forma alternativa, un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII
5 puede comprender un péptido C-terminal de hasta 5 aminoácidos de longitud. En una modalidad, el péptido C-terminal comprende 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

El experto en la técnica es capaz de deducir a partir de una secuencia del dominio variable individual dado, por ejemplo, uno que tenga
10 una secuencia como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 y 287 cuyas secuencias de la CDR estén contenidas dentro de ellas, usando los varios métodos esbozados en la presente, por ejemplo, secuencias de la CDR según es definido haciendo referencia a los métodos
15 de Kabat (1987), Chothia (1989), AbM o por contacto, o una combinación de estos métodos. Convenientemente, las secuencias de la CDR se determinan usando el método de Kabat descrito en la presente. En una modalidad, las secuencias de la CDR de cada secuencia, son aquellas expuestas en los cuadros 1, 2, 9 y 13.

20 En un aspecto de la invención, un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de la descripción tiene 90% o más de 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-28.

En un aspecto de la invención, un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de la descripción tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-28, con 25 o menos cambios de aminoácido. En una modalidad particular, un dominio

5 variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de la descripción tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-28, con 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos o 5 o menos, cambios de aminoácido.

En un aspecto de la descripción, se provee un polipéptido

10 aislado que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de la descripción, en particular un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283,

15 285 y 287, en donde dicho polipéptido aislado se une al TGFbetaRII.

En un aspecto de la descripción, se provee un polipéptido aislado codificado por una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 80% idéntica a por lo menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de: SEQ ID NOS: 39-66, en donde dicho polipéptido aislado se une al

20 TGFbetaRII.

Un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o un polipéptido de conformidad con cualquier aspecto de la descripción, puede comprender cualquiera de los siguientes aminoácidos: R

en la posición 39, I en la posición 48, D en la posición 53, N en la posición 61, R en la posición 61, K en la posición 61, R en la posición 64, F en la posición 64, D en la posición 64, E en la posición 64, Y en la posición 64, H en la posición 102 o S en la posición 103 del dominio variable individual de

5 inmunoglobulina, dicha posición estando de acuerdo con la convención de numeración de Kabat. En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido comprende una combinación de estos aminoácidos. En otra modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido comprende el aminoácido N en 61 y R en 64.

10 En otra modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido comprende el aminoácido R o K en la posición 61. En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII comprende una I en la posición 48 además de cualquiera de los residuos mencionados anteriormente en la posición 61 y/o 64. En estas modalidades, la

15 numeración de aminoácidos es aquella del dominio variable individual de inmunoglobulina, según es ejemplificado, por ejemplo, por aquellas secuencias dadas en SEQ ID NOs: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 y 287.

Un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-

20 TGFbetaRII o polipéptido de conformidad con cualquier aspecto de la descripción, puede comprender una de las siguientes combinaciones de aminoácidos seleccionada del grupo: N en la posición 61 y R en la posición 64; R en la posición 61 y E en la posición 64; R en la posición 61 y M en la

posición 64; R en la posición 61 y F en la posición 64; R en la posición 61 y Y en la posición 64; y R en la posición 61 y D en la posición 64 del dominio variable individual de inmunoglobulina. En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII comprende una I en la posición
5 48 además de cualquiera de la combinación de residuos mencionada anteriormente en las posiciones 61 y 64.

En otro aspecto, se provee un ligando o porción de unión que tiene especificidad de unión por el TGFbetaRII, e inhibe la unión de un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que
10 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NOs: 1-28 al TGFbetaRII.

En otro aspecto de la descripción, se provee una proteína de fusión que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido o ligando de conformidad con cualquier aspecto de la descripción.
15 En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión de conformidad con la descripción, es uno que neutraliza la actividad del TGFbeta. Convenientemente, el dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido de conformidad con la descripción inhibe la unión del TGFbeta al
20 TGFbetaRII. En otra modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido de conformidad con la descripción, inhibe la actividad de señalización del TGFbeta a través del TGFbetaRII. En otra modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido de

conformidad con la descripción suprime la actividad del TGFbeta, en particular, la actividad de crecimiento celular y/o actividad fibrogénica del TGFbeta. Convenientemente, el TGFbetaRII es el TGFbetaRII de humano.

En una modalidad, el dominio variable individual de
5 inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión de conformidad con la descripción, carece de actividad agonista del TGFbetaRII a 15 micromolar (μM).

En otro aspecto, se provee un dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión de conformidad con
10 cualquier aspecto de la descripción, que comprende adicionalmente una porción que extiende la vida media. Convenientemente, la porción que extiende la vida media es una porción de polietilenglicol, albúmina de suero o un fragmento de la misma, receptor de transferrina o una porción de unión a transferrina del mismo, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que
15 comprende un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*. En una modalidad, la porción que extiende la vida media es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión para albúmina de suero o receptor de Fc neonatal. En otra modalidad, la porción que extiende la vida media es un dAb, anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

20 En otro aspecto, la descripción provee un ácido nucleico recombinante o aislado que codifica para un polipéptido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido, ligando o proteína de fusión de conformidad con cualquier aspecto de la

descripción.

En una modalidad, la molécula de ácido nucleico recombinante o aislada comprende o consiste de una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 39-76, 203, 205, 207, 212, 233, 235, 237, 239, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284 y 286.

En un aspecto, la descripción provee un ácido nucleico recombinante o aislado, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 39-66, y en donde el ácido nucleico codifica para un polipéptido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina que se une específicamente al TGFbetaRII.

En otro aspecto, se provee un vector que comprende un ácido nucleico de conformidad con la descripción.

En otro aspecto, se provee una célula hospedera que comprende un ácido nucleico o un vector de conformidad con la descripción. En otro aspecto de la descripción, se provee un método de producción de un polipéptido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o un polipéptido o ligando o una proteína de fusión de conformidad con la descripción, el método comprendiendo mantener una célula hospedera de conformidad con la descripción bajo condiciones

adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico o vector, por lo cual un polipéptido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido o ligando o proteína de fusión, es producido. Opcionalmente, el método comprende además el paso de aislar el polipéptido y opcionalmente
5 producir una variante, por ejemplo, una variante mutada, que tiene una afinidad mejorada (Kd); o EC50 para la neutralización del TGFbeta en una prueba estándar, que el polipéptido aislado. Pruebas adecuadas para la actividad del TGFbeta, tal como una prueba del sensor de células, se describen en la presente, por ejemplo, en la sección de ejemplos.

10 En un aspecto de la descripción, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido o ligando o proteína de fusión de conformidad con la descripción, es para su uso como un medicamento. Por consiguiente, se provee una composición que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido o ligando o
15 proteína de fusión de conformidad con la descripción, para su uso como un medicamento.

En un aspecto de la descripción, se provee un uso de un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido o ligando o proteína de fusión de conformidad con la descripción, en la fabricación de un
20 medicamento, en particular para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la señalización del TGFbeta.

Convenientemente, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido o ligando o proteína de fusión o

composición de conformidad con la descripción, es para el tratamiento de una enfermedad asociada con la señalización del TGFbeta. Convenientemente, la enfermedad es una fibrosis de tejido, tal como fibrosis pulmonar que incluye fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis hepática, que incluye cirrosis y hepatitis crónica; artritis reumatoide; trastornos oculares; o fibrosis de la piel que incluye queloide de la piel; contractura de Dupuytren; y fibrosis renal tal como nefritis y nefrosclerosis; o una condición vascular tal como restenosis. Otras enfermedades asociadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades vasculares tales como hipertensión, pre-eclampsia, telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (HHT1), HHT2, hipertensión arterial pulmonar, aneurismas aórticos, síndrome de Marfan, trastorno de aneurisma familiar, síndrome de Loews-Dietz y síndrome de tortuosidad arterial (ATS). Otras enfermedades asociadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades del sistema musculoesquelético, tales como distrofia muscular de Duchenne y fibrosis muscular. Otras enfermedades asociadas con la señalización del TGFbeta incluyen cáncer, tal como cáncer de colon, gástrico y pancreático, así como glioma y NSCLC. Además, la descripción provee métodos para elegir como objetivo el cáncer modulando la señalización del TGFbeta en angiogénesis tumoral. Otras enfermedades o condiciones incluyen aquellas relacionadas con la cicatrización de tejidos. Otras enfermedades incluyen enfermedades pulmonares tales como EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica). Un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido o ligando o proteína de fusión o

composición de conformidad con la descripción, puede usarse en la curación de heridas y/o para prevenir o mejorar la formación de cicatrices. En un aspecto, la descripción provee el dominio variable individual anti-TGFbetaRII, ligando o antagonista, composición o proteína de fusión, para suministro intradérmico. En un aspecto, la descripción provee el dominio variable individual anti-TGFbetaRII, ligando o antagonista o proteína de fusión, para suministro a la piel de un paciente. En un aspecto, la descripción provee el uso del dominio variable individual anti-TGFbetaRII, ligando o antagonista o proteína de fusión, en la fabricación de un medicamento para suministro intradérmico. En un aspecto, la descripción provee el uso del dominio variable individual anti-TGFbetaRII o antagonista o proteína de fusión de conformidad con la descripción, en la fabricación de un medicamento para suministro a la piel de un paciente.

En una modalidad, el dominio variable es sustancialmente monomérico. En una modalidad particular, el dominio variable es 65%-98% monomérico en solución, según se determina mediante SEC-MALLS. En otra modalidad, el dominio variable es 65%-100%, 70%-100%, 75%-100%, 80%-100%, 85%-100%, 90%-100% o 95%-100% monomérico en solución, según se determina mediante SEC-MALLS.

En otra modalidad, el dominio variable, ligando, proteína de fusión o polipéptido como se describe en la presente, en particular cuando está en una composición farmacéutica, no contiene alguna o una combinación o la totalidad de las siguientes modificaciones post-traducción: desamidación,

oxidación o glucosilación. En una modalidad particular, el dominio variable, ligando, proteína de fusión o polipéptido de conformidad con la descripción, no se desamida.

Convenientemente, la composición es para la terapia o profilaxis
5 de una condición mediada por el TGFbeta en un humano.

Por consiguiente, en una modalidad, se provee un dAb anti-TGFbetaRII para el tratamiento de fibrosis de la piel, en particular enfermedad queiloide o contractura de Dupuytren. Convenientemente, el dAb anti-TGFbetaRII se provee como un dAb sustancialmente monomérico para
10 suministro intradérmico, de preferencia careciendo de algún marcador (es decir, no marcado), tal como un marcador myc u otro marcador de purificación.

En un aspecto, la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente
15 aceptable.

En otro aspecto, se provee un método de tratamiento y/o prevención de una condición mediada por el TGFbeta en un paciente humano, el método comprendiendo administrar una composición que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido o
20 ligando de conformidad con la descripción, al paciente.

En otro aspecto, la descripción provee un dispositivo de suministro intradérmico que contiene una composición de conformidad con la descripción. Convenientemente, dicho dispositivo es una microaguja o

colección de microagujas.

En otro aspecto, se provee un kit que comprende un dominio variable individual anti-TGFbetaRII o polipéptido como se describe en la presente y un dispositivo, tal como un dispositivo de suministro intradérmico,
5 para aplicar dicho dominio variable individual o polipéptido a la piel.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Dentro de esta especificación, la descripción se ha descrito, con
10 relación a modalidades, en una manera que permite que una especificación clara y concisa sea escrita. Se pretende y debe apreciarse que las modalidades pueden ser diversamente combinadas o separadas sin que se aparten de la descripción.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos
15 técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como lo entienden comúnmente los expertos en la técnica (por ejemplo, en técnicas de cultivo de células, genética molecular, química de ácidos nucleicos e hibridación y bioquímica). Técnicas estándar se usan para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase en general, Sambrook, *et al.*,
20 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a. ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., y Ausubel, *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4a. ed; John Wiley & Sons, Inc., citas que se incorporan en la presente como referencia) y métodos químicos.

Inmunoglobulina: Como se usa en la presente, el término “inmunoglobulina” se refiere a una familia de polipéptidos que retienen la característica de plegamiento de inmunoglobulina de las moléculas de anticuerpo, las cuales contienen dos láminas β y, usualmente, un enlace
5 disulfuro conservado.

Dominio: Como se usa en la presente, el término “dominio” se refiere a una estructura de proteína plegada que retiene su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en
10 muchos casos pueden ser añadidos, removidos o transferidos a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Por dominio variable individual de anticuerpo o dominio variable individual de inmunoglobulina, se entiende un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de los dominios variables del
15 anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables completos del anticuerpo y dominios variables modificados, por ejemplo, en los cuales uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables del anticuerpo, o dominios variables del anticuerpo que han sido truncados o comprenden extensiones N- o C-terminales, así como
20 fragmentos plegados o dominios variables que retienen por lo menos parte de la actividad de unión y especificidad del dominio de longitud completa.

Dominio variable individual de inmunoglobulina: La frase “dominio variable individual de inmunoglobulina” se refiere a un dominio

variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) o dominio de unión que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones o dominios V diferentes, es decir, es monovalente. Un dominio variable individual de inmunoglobulina puede estar presente en un formato

5 (por ejemplo, homo- o hetero-multímero) con otras regiones variables o dominios variables en donde las otras regiones o dominios no se requieren para la unión al antígeno por el dominio variable individual de inmunoglobulina (es decir, en donde el dominio variable individual de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un

10 “anticuerpo de dominio” o “dAb”, es un “dominio variable individual de inmunoglobulina” como el término se usa en la presente. Un “dominio variable individual de anticuerpo” o un “dominio variable individual de anticuerpo”, es lo mismo que un “dominio variable individual de inmunoglobulina” como el término se usa en la presente. Un dominio variable individual de

15 inmunoglobulina es en una modalidad un dominio variable de anticuerpo de humano, pero incluye también dominios variables individuales de anticuerpo de otras especies tales como roedor (por ejemplo, como se describe en el documento WO 00/29004, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en la presente como referencia), así como dAbs de V_{HH} de tiburón nodriza y

20 camélido. Los V_{HH} de camélido son polipéptidos de dominio variable individual de inmunoglobulina que se derivan de especies que incluyen al camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada carentes naturalmente de cadenas ligeras. El V_{HH} puede ser

humanizado.

En todos los aspectos de la descripción, el dominio variable individual de inmunoglobulina se selecciona independientemente de dominios variables individuales de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo, por ejemplo V_H , V_L y V_{HH} .

Como se usa en la presente, un “anticuerpo” se refiere a una IgG, IgM, IgA, IgD o IgE o un fragmento (tal como un fragmento Fab, $F(ab')_2$, Fv, Fv enlazado a disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv enlazado a disulfuro, cuerpo completo), ya sea derivado de alguna especie que produzca naturalmente un anticuerpo, o creado mediante tecnología de ADN recombinante; ya sea aislado de, por ejemplo, suero, células B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias.

Formato de anticuerpo: En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido o ligando de conformidad con la descripción, puede proveerse en cualquier formato de anticuerpo. Como se usa en la presente, el término “formato de anticuerpo” se refiere a cualquier estructura de polipéptido adecuada en la cual uno o más dominios variables del anticuerpo pueden ser incorporados para conferir especificidad de unión por el antígeno en la estructura. Una variedad de formatos de anticuerpo adecuados se conocen en la técnica, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o

cadenas ligeras de anticuerpo, fragmentos de unión al antígeno de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, un fragmento Fv (por ejemplo, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv unido a disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂), un dominio variable individual de anticuerpo (por ejemplo, un dAb, V_H, V_{HH}, V_L), y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, modificadas mediante la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado o un V_{HH} humanizado). En una modalidad, los formatos de anticuerpo alternativos incluyen andamios alternativos en los cuales las CDRs de cualquier molécula de conformidad con la descripción pueden ser injertadas en un andamio o esqueleto de proteína adecuado, tal como un aficuerpo, un andamio de SpA, un dominio de clase A de receptor de LDL, un avímero (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de E.U.A. publicación Nos. 2005/0053973, 2005/0089932, 2005/0164301), o un dominio del EGF. Además, el ligando puede ser bivalente (heterobivalente) o multivalente (heteromultivalente), como se describe en la presente. En otras modalidades, puede usarse una "estructura universal", en donde la "estructura universal" se refiere a una secuencia de estructura individual de anticuerpo que corresponde a las regiones de un anticuerpo conservadas en secuencia como es definido por Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services), o que corresponden al repertorio de inmunoglobulinas o estructuras de la línea germinal humana, como es definido por Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 910-917. La descripción provee el uso de una estructura individual, o una serie de dichas estructuras,

que se ha encontrado permiten la derivación de virtualmente cualquier especificidad de unión a través de la variación en las regiones hipervariables solas.

En modalidades de la descripción descritas a lo largo de esta descripción, en lugar del uso de un “dAb” anti-TGFbetaRII en un péptido o ligando de la descripción, se contempla que el experto en la técnica pueda usar un polipéptido o dominio que comprenda una o más o la totalidad de las 3 CDRs de un dAb de la descripción que se une al TGFbetaRII (por ejemplo, CDRs injertadas en un andamio o esqueleto de proteína adecuado, por ejemplo, un aficuerpo, un andamio de SpA, un dominio de clase A de receptor de LDL o un dominio del EGF). La descripción como un todo se construirá por consiguiente para proveer la descripción de polipéptidos usando dichos dominios en lugar de un dAb. A este respecto, véase el documento WO2008096158, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia.

En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII es cualquier dominio variable de inmunoglobulina adecuado, y opcionalmente es un dominio variable de humano o un dominio variable que comprenda o se derive de una región de estructura de humano (por ejemplo, las regiones de estructura DP47 o DPK9).

Antígeno: Como se describe en la presente, un “antígeno” es una molécula que es unida por un dominio de unión de conformidad con la presente descripción. Típicamente, los antígenos son unidos por ligandos de

anticuerpo y son capaces de producir una respuesta de anticuerpo *in vivo*. Puede ser, por ejemplo, un polipéptido, proteína, ácido nucleico u otra molécula.

Epítoto: Un “epítoto” es una unidad de estructura unida
5 convencionalmente por un par de V_H/V_L de inmunoglobulina. Los epítotos definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo, y de esta manera representan el objetivo de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de dominio individual, un epítoto representa la unidad de estructura unida por un dominio variable en aislamiento.

10 Unión: Típicamente, la unión específica es indicada por una constante de disociación (K_d) de 50 nanomolar o menos, opcionalmente 250 picomolar o menos. La unión específica de una proteína de unión al antígeno para un antígeno o epítoto puede determinarse mediante una prueba adecuada que incluye, por ejemplo, el análisis de Scatchard y/o pruebas de
15 unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos de enzimas tales como ELISA y pruebas de competencia en sandwich, y las diferentes variantes de las mismas.

Afinidad de unión: La afinidad de unión se determina opcionalmente usando la resonancia de plasmones de superficie (SPR) y
20 BIACORE™ (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema BIACORE™ (Uppsala, Suecia). El sistema BIACORE™ usa la resonancia de plasmones de superficie (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23:1; Morton y Myszka, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) para monitorear las interacciones

biomoleculares en tiempo real, y usa la resonancia de plasmones de superficie que puede detectar cambios en el ángulo de resonancia de la luz en la superficie de una película de oro delgada sobre un soporte de vidrio como resultado de cambios en el índice de refracción de la superficie hasta 300 nm de distancia. El análisis BIACORE™ genera convenientemente constantes de velocidad de asociación, constantes de velocidad de disociación, constantes de disociación en equilibrio y constantes de afinidad. La afinidad de unión se obtiene evaluando las constantes de velocidad de asociación y disociación usando un sistema de resonancia de plasmones de superficie BIACORE™ (BIACORE™, Inc.). Un chip biosensor es activado por el acoplamiento covalente del objetivo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BIACORE™). El objetivo es entonces diluido e inyectado sobre el chip para obtener una señal en unidades de respuesta de material inmovilizado. Puesto que la señal en unidades de resonancia (RU) es proporcional a la masa del material inmovilizado, esto representa una escala de densidades del objetivo inmovilizado sobre la matriz. Los datos de disociación se ajustan a un modelo de un sólo sitio para obtener la $k_{off} \pm$ s.d. (desviación estándar de las mediciones). Se calculan las constantes de velocidad de pseudo primer orden (K_d 's) para cada curva de asociación, y se grafican como una función de la concentración de proteína para obtener el $k_{on} \pm$ s.e. (error estándar del ajuste). Las constantes de disociación en equilibrio para la unión, K_d 's, se calculan a partir de mediciones de la SPR como k_{off}/k_{on} .

Otro aspecto de la descripción provee un dominio variable

individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que se une específicamente al TGFbetaRII de humano. En una modalidad, el dominio variable se une al TGFbetaRII de humano con una constante de disociación (KD) en equilibrio de aproximadamente 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM o menos, 5 opcionalmente aproximadamente 9, 8, 7, 6 o 5 nM o menos, opcionalmente aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos o aproximadamente 2 nM o menos o aproximadamente 1 nM o menos, opcionalmente aproximadamente 500 pM o menos. Convenientemente, en donde el dominio variable tiene una constante de disociación en equilibrio en 10 la escala de aproximadamente 50 nM a 500 pM, es particularmente adecuado para administración local a un tejido de interés tal como el pulmón. En esta modalidad, una alta concentración de dicho enlazador de “afinidad moderada” puede proveerse como una terapéutica efectiva. En otra modalidad, el dominio variable se une al TGFbetaRII de humano con una constante de disociación 15 (KD) en equilibrio de aproximadamente 500 pM o menos, opcionalmente aproximadamente 450 pM, 400 pM, 350 pM, 300 pM, 250 pM, 200 pM, 150 pM, 100 pM, 50 pM o menos, opcionalmente aproximadamente 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM o menos. Convenientemente, en donde el dominio variable tiene una constante de disociación en la escala de aproximadamente 500 pM 20 a 10 pM, es particularmente adecuado para administración sistémica, tal que la cantidad en cualquier tejido de interés, es suficiente para proveer una terapia efectiva. En esta modalidad, una baja concentración de dicho enlazador de “alta afinidad” puede proveerse como una terapéutica efectiva.

En una modalidad, los dominios variables individuales de la presente descripción muestran reactividad cruzada entre el TGFbetaRII de humano y el TGFbetaRII de otra especie, tal como el TGFbetaRII de ratón. En esta modalidad, los dominios variables se unen específicamente al

5 TGFbetaRII de humano y de ratón. Esto es particularmente útil, puesto que el desarrollo de fármacos requiere típicamente la prueba de candidatos de fármaco guías en sistemas de ratón antes de que el fármaco sea puesto a prueba en humanos. La provisión de un fármaco que puede unirse a las especies de humano y de ratón permite poner a prueba los resultados en este

10 sistema, y permite hacer comparaciones codo a codo de datos usando el mismo fármaco. Esto evita la complicación de la necesidad de encontrar un fármaco que funcione contra un TGFbetaRII de ratón y un fármaco separado que funcione contra el TGFbetaRII de humano, y evita también la necesidad de comparar los resultados en humanos y ratones usando fármacos no

15 idénticos. Se contempla también la reactividad cruzada entre otras especies usadas en modelos de enfermedad tales como perros, o monos tales como el mono Cynomolgus.

Opcionalmente, la afinidad de unión del dominio variable individual de inmunoglobulina por cuando menos el TGFbetaRII de ratón, y la

20 afinidad de unión por el TGFbetaRII de humano, difieren por no más de un factor de 10, 50 o 100.

CDRs: Los dominios variables individuales de inmunoglobulina (dAbs) descritos en la presente contienen regiones determinantes de

complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). Los sitios de las CDRs y las regiones de estructura (FR) y un sistema de numeración, han sido definidos por Kabat *et al.* (Kabat, E. A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Las secuencias de aminoácidos de las CDRs (CDR1, CDR2, CDR3) de los dAbs V_H (CDRH1, etc.) y V_L (CDRL1, etc.) (V_K) descritos en la presente, serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica con base en el sistema de numeración de aminoácidos bien conocido de Kabat y la definición de las CDRs. De acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, el método usado más comúnmente basado en la variabilidad de la secuencia, la CDR-H3 de cadena pesada tiene longitudes variables, y las inserciones se enumeran entre el residuo H100 y H101 con letras hasta la K (es decir, H100, H100A ... H100K, H101). Las CDRs pueden determinarse en forma alternativa usando el sistema de Chothia (basado en la localización de las regiones de bucle estructurales) (Chothia *et al.*, (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, p 877-883), de acuerdo con AbM (compromiso entre Kabat y Chothia), o de acuerdo con el método de contacto (basado en las estructuras cristalinas y la predicción de los residuos de contacto con el antígeno), como sigue. Véase <http://www.bioinf.org.uk/abs/> para métodos adecuados para la determinación de las CDRs.

Una vez que cada residuo ha sido enumerado, pueden aplicarse entonces las siguientes definiciones de la CDR:

Kabat:

CDR H1: 31-35/35A/35B

CDR H2: 50-65

CDR H3: 95-102

5

CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

CDR L3: 89-97

Chothia:

CDR H1: 26-32

10

CDR H2: 52-56

CDR H3: 95-102

CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

CDR L3: 89-97

15

AbM:

(usando la numeración de Kabat): (usando la numeración de Chothia):

CDR H1: 26-35/35A/35B

26-35

CDR H2: 50-58

-

CDR H3: 95-102

-

20

CDR L1: 24-34

-

CDR L2: 50-56

-

CDR L3: 89-97

-

Por contacto:

(usando la numeración de Kabat): (usando la numeración de Chothia):

	CDR H1: 30-35/35A/35B	30-35
	CDR H2: 47-58	-
	CDR H3: 93-101	-
5	CDR L1: 30-36	-
	CDR L2: 46-55	-
	CDR L3: 89-96	-

("-" significa la misma numeración que la de Kabat).

Por consiguiente, el experto en la técnica es capaz de hacer una deducción a partir de una secuencia de dominio variable individual dado, por ejemplo, uno que tenga una secuencia como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 y 287, cuyas secuencias de la CDR estén contenidas dentro de ellas usando los varios métodos esbozados en la presente. Por ejemplo, para una secuencia del dominio variable individual dado, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, el experto en la técnica es capaz de determinar las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 contenidas en las mismas, usando cualquiera o una combinación de los métodos de definición de la CDR mencionados anteriormente. Cuando se usa la definición de la CDR de Kabat, el experto en la técnica es capaz de determinar que las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3, son aquellas expuestas en SEQ ID NO: 77, 113 y 149, respectivamente. Convenientemente, las secuencias de la CDR se determinan usando el método de Kabat descrito en la presente. En

una modalidad, las secuencias de la CDR de cada secuencia son aquellas expuestas en los cuadros 1, 2, 9 y 13. En una modalidad, una secuencia de la CDR1 es una secuencia de la CDR1 seleccionada de SEQ ID NO: 77-112, 241, 244, 247 y 250. En una modalidad, una secuencia de la CDR2 es una
5 secuencia de la CDR2 seleccionada de SEQ ID NO: 113-148, 242, 245, 248 y 251. En una modalidad, una secuencia de la CDR3 es una secuencia de la CDR3 seleccionada de SEQ ID NO: 149-184, 243, 246, 249 y 252.

Una unidad de unión variante o variante de la CDR, incluye una secuencia de aminoácidos modificada por cuando menos un aminoácido, en
10 donde dicha modificación puede ser una alteración química o parcial de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, por no más de 10 aminoácidos), cuya modificación permite que la variante retenga las características biológicas de la secuencia no modificada. Por ejemplo, la variante es una variante funcional que se une específicamente al TGFbetaRII. Una alteración parcial de la
15 secuencia de aminoácidos de la CDR puede ser por la delección o sustitución de uno a varios aminoácidos, o por la adición o inserción de uno a varios aminoácidos, o por una combinación de las mismas (por ejemplo, por no más de 10 aminoácidos). La unidad de unión variante o variante de la CDR puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones, adiciones, o delecciones de aminoácido,
20 en cualquier combinación, en la secuencia de aminoácidos. La variante de la unidad de unión o variante de la CDR puede contener 1, 2 o 3 sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácido, en cualquier combinación, en la secuencia de aminoácidos. Las sustituciones en los residuos de aminoácido

pueden ser sustituciones conservativas, por ejemplo, sustituyendo con un aminoácido hidrofóbico un aminoácido hidrofóbico alternativo. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida con valina, o isoleucina.

TGFbetaRII: Como se usa en la presente, el término

5 “TGFbetaRII” (receptor del factor de crecimiento transformante beta tipo II; TGFβRII) se refiere a proteínas del TGFbetaRII de mamífero endógenas o de

ocurrencia natural, y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que la de una proteína del TGFbetaRII endógena o de

ocurrencia natural de mamífero correspondiente (por ejemplo, proteínas

10 recombinantes, proteínas sintéticas (es decir, producidas usando los métodos de química orgánica de síntesis)). Por consiguiente, como se define en la presente, el término incluye proteína del TGFbetaRII madura, variantes

polimórficas o alélicas, y otras isoformas del TGFbetaRII y formas modificadas o no modificadas de las anteriores (por ejemplo, lipidadas, glucosiladas). El

15 TGFbetaRII endógeno o de ocurrencia natural incluye proteínas de tipo silvestre tales como TGFbetaRII maduro, variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas y formas mutantes que ocurren naturalmente en mamíferos (por ejemplo, humanos, primates no humanos). Dichas proteínas pueden

recuperarse o aislarse de una fuente que expresa naturalmente el

20 TGFbetaRII, por ejemplo. Estas proteínas y proteínas que tienen la misma secuencia de aminoácidos como un TGFbetaRII endógeno o de ocurrencia natural correspondiente, son referidas por el nombre del mamífero correspondiente. Por ejemplo, en donde el mamífero correspondiente es un

humano, la proteína se designa como un TGFbetaRII de humano. El TGFbetaRII de humano es descrito, por ejemplo, por Lin, *et al.*, Cell 1992, Vol. 68(4), p. 775-785, y el No. de acceso del Genbank M85079.

El TGFbetaRII de humano es un receptor de transmembrana que
5 consiste de 567 aminoácidos con un dominio extracelular de
aproximadamente 159 aminoácidos, un dominio de transmembrana y un
dominio citoplásmico que comprende un dominio de proteína cinasa para la
transducción de señales. Como se usa en la presente, el “TGFbetaRII” incluye
también una porción o fragmento del TGFbetaRII. En una modalidad, dicha
10 porción o fragmento incluye el dominio extracelular del TGFbetaRII o una
porción del mismo.

Por el término “anti-TGFbetaRII” con relación a un dominio
variable individual de inmunoglobulina, polipéptido, ligando, proteína de fusión,
etc., se entiende una porción que reconoce y se une al TGFbetaRII. En una
15 modalidad un “anti-TGFbetaRII” reconoce específicamente y/o se une
específicamente a la proteína del TGFbetaRII y, convenientemente, el
TGFbetaRII de humano. En otra modalidad, el dominio variable individual de
inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la descripción, se une
también al TGFbetaRII de ratón (número de acceso del GenBank
20 NM_029575; descrito, por ejemplo, en Massague *et al.*, Cell 69 (7), 1067-1070
(1992)).

El “TGFbeta” incluye isoformas tales como TGFbeta1, TGFbeta2
y TGFbeta3.

El TGFbeta se une al TGFbetaRII y, en un complejo con el TGFbetaRI, inicia una vía de señalización. Por consiguiente, la actividad del TGFbeta y la inhibición o neutralización de la actividad del TGFbeta puede determinarse a través de cualquier prueba que mida un resultado de la
5 señalización del TGFbeta. La señalización del TGFbeta se revisa, por ejemplo, en Itoh, *et al.*, Eur. J. Biochem 2000, Vol. 267, p. 6954; y en Dennler, *et al.*, Journal of Leucocyte Biol. 2002, 71 (5), p. 731-40. De esta manera, la actividad del TGFbeta puede ponerse a prueba en muchas pruebas diferentes bien conocidas por los expertos en la técnica. El término “inhibición” o
10 “neutralización” significa que una actividad biológica del TGFbeta es reducida totalmente o parcialmente en presencia del dominio variable individual de inmunoglobulina de la presente descripción, en comparación con la actividad del TGFbeta en ausencia de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina.

15 En una modalidad, una inhibición o neutralización de la actividad del TGFbeta se pone a prueba en una prueba de liberación de IL-11. En esta modalidad, la capacidad del dominio variable individual de inmunoglobulina de conformidad con la descripción se pone a prueba por su capacidad para inhibir el TGFbeta1 de humano (TGFbeta1; TGF- β 1), y estimula la liberación
20 de IL-11 de células tales como las células A549. El TGFbeta1 (TGF- β 1) se une directamente al TGFbetaRII (TGF- β RII), e induce el ensamble del complejo TGFbetaRI/RII (TGF- β RI/II). El TGFbetaRI (TGF- β RI) es fosforilado y es capaz de señalizar a través de varias vías que incluyen la vía Smad 4. La

activación de la vía Smad 4 resulta en la liberación de IL-11. La IL-11 es secretada en el sobrenadante de células, y es medida entonces mediante ELISA colorimétrica. Pruebas de liberación de IL-11 adecuadas se describen en la presente, tales como el kit de prueba de ELISA Quantikine para IL-11 de humano provisto por R & D Systems (ref. D1100).

En otra modalidad, la actividad del TGFbeta se pone a prueba en una prueba para la capacidad del dominio variable individual de inmunoglobulina de conformidad con la descripción, para inhibir la expresión de la CAGA-luciferasa inducida por el TGFbeta en células MC3T3-E1 en una prueba de luciferasa en células MC3T3-E1. Tres copias de un motivo de secuencia sensible al TGFbeta, denominado caja CAGA, están presentes en el promotor PAI-1 de humano, y se unen específicamente a las proteínas Smad3 y 4. La clonación de copias múltiples de la caja CAGA en una construcción de reportero de luciferasa, confiere sensibilidad del TGFbeta a las células transfectadas con el sistema de reportero. Una prueba adecuada se describe en la presente, y usa células MC3T3-E1 (osteoblastos de ratón) transfectadas establemente con una construcción de reportero de [CAGA]₁₂-luciferasa (Dennler, *et al.*, (1998) EMBO J. 17, 3091–3100).

Otras pruebas adecuadas incluyen una prueba celular de beta-lactamasa SBE de humano (INVITROGEN®, prueba del sensor de células). Ejemplos de pruebas adecuadas se describen en la presente.

Convenientemente, el dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión de conformidad con

la descripción, no activa por sí mismo la señalización del receptor TGFbetaRII. Por consiguiente, en una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión de conformidad con la descripción, carece de actividad agonista a 10 μ M. La actividad agonista puede determinarse poniendo a prueba un compuesto de interés en una prueba del TGFbetaRII como se describe en la presente, en ausencia del TGFbeta. En donde el TGFbeta está ausente, la actividad agonista de un compuesto de interés se detectaría detectando la señalización del TGFbetaRII.

Homología: Secuencias similares u homólogas (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia) con las secuencias descritas en la presente, son también parte de la descripción. En algunas modalidades, la identidad de secuencia al nivel de aminoácidos puede ser de aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor. Al nivel de ácidos nucleicos, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor. En forma alternativa, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ácido nucleico hibridan bajo condiciones de hibridación selectiva (por ejemplo, condiciones de hibridación de muy alta severidad), con el complemento de la cadena. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de células, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

Como se usa en la presente, los términos condiciones de “baja severidad”, “severidad media”, “alta severidad” o “muy alta severidad”, describen condiciones para la hibridación de ácidos nucleicos y el lavado de los mismos. Una guía para llevar a cabo las reacciones de hibridación puede encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, cita incorporada en su totalidad en la presente como referencia. Métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia, y pueden usarse. Las condiciones de hibridación específicas referidas en la presente, son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de baja severidad en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en 0.2X SSC, SDS a 0.1% por lo menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede incrementarse hasta 55°C para las condiciones de baja severidad); (2) condiciones de hibridación de severidad media en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0.2X SSC, SDS a 0.1% a 60°C; (3) condiciones de hibridación de alta severidad en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0.2X SSC, SDS a 0.1% a 65°C; y opcionalmente (4) condiciones de hibridación de muy alta severidad son fosfato de sodio 0.5 M, SDS a 7% a 65°C, seguido de uno o más lavados a 0.2X SSC, SDS a 1% a 65°C. Las condiciones de muy alta severidad (4) son las condiciones preferidas, y las que deben usarse a menos que se especifique de otra manera.

Los cálculos de “homología” o “identidad de secuencia” o “similitud” entre dos secuencias (los términos se usan recíprocamente en la

presente), se llevan a cabo como sigue. Las secuencias son alineadas para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse espacios intermedios en una de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico, o ambas, para alineación óptima, y secuencias no homólogas pueden ser pasadas por alto para propósitos de comparación). En una modalidad, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es por lo menos aproximadamente 30%, opcionalmente por lo menos aproximadamente 40%, opcionalmente por lo menos aproximadamente 50%, opcionalmente por lo menos aproximadamente 60%, y opcionalmente por lo menos aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes, se comparan entonces. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente, la “homología” de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a la “identidad” de aminoácidos o ácidos nucleicos). El por ciento de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de espacios intermedios, y la longitud de cada espacio intermedio, que necesitan ser introducidos para la alineación óptima de las dos secuencias.

Las alineaciones y la homología, similitud o identidad de las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos, como se definen en la presente, opcionalmente se preparan y se determinan usando el algoritmo de secuencias BLAST 2, usando parámetros predeterminados (Tatusova, T. A. *et al.*, FEMS Microbiol Lett, 174: 187-188 (1999)). En forma alternativa, se usa el algoritmo BLAST (versión 2.0) para la alineación de secuencias, con parámetros establecidos para valores predeterminados. BLAST (herramienta de búsqueda de alineación local básica), es el algoritmo de búsqueda heurístico usado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx; estos programas adscriben significancia a sus hallazgos usando los métodos estadísticos de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6): 2264-8.

Ligando: Como se usa en la presente, el término “ligando” se refiere a un compuesto que comprende por lo menos una porción de péptido, polipéptido o proteína que tiene un sitio de unión con especificidad de unión por el TGFbetaRII. Un ligando puede ser referido también como una “porción de unión”.

Los ligandos o porciones de unión de conformidad con la descripción, comprenden opcionalmente dominios variables de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades de unión, y no contienen pares de dominio variables que en conjunto forman un sitio de unión para el compuesto objetivo (es decir, no comprenden un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina y un dominio variable de cadena ligera de

inmunoglobulina que en conjunto forman un sitio de unión para el TGFbetaRII). Opcionalmente, cada dominio que tiene un sitio de unión que tiene especificidad de unión por un objetivo, es un dominio variable individual de inmunoglobulina (por ejemplo, dominio variable individual de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, V_H , V_{HH}), dominio variable individual de cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, V_L)) que tiene especificidad de unión por un objetivo deseado (por ejemplo, el TGFbetaRII).

De esta manera, los “ligandos” incluyen polipéptidos que comprenden dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, en donde cada dominio variable individual de inmunoglobulina se une a un diferente objetivo. Los ligandos incluyen también polipéptidos que comprenden por lo menos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina o las secuencias de la CDR de los dominios variables individuales que se unen a diferentes objetivos en un formato adecuado, tal como un formato de anticuerpo (por ejemplo, formato tipo IgG, scFv, Fab, Fab', $F(ab')_2$) o un andamio o esqueleto de proteína adecuado, tal como un anticuerpo, un andamio de SpA, un dominio de clase A de receptor de LDL, un dominio del EGF, avímero y ligandos doblemente- y multi-específicos como se describen en la presente.

El dominio del polipéptido que tiene un sitio de unión que tiene especificidad de unión por un objetivo (por ejemplo, el TGFbetaRII), puede ser también un dominio de proteína que comprende un sitio de unión para un objetivo deseado, por ejemplo, y un dominio de proteína se selecciona de un

aficuerpo, un dominio de SpA, un dominio de clase A de receptor de LDL, un avímero (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de E.U.A. publicación Nos. 2005/0053973, 2005/0089932, 2005/0164301). Si se desea, un “ligando” puede comprender además una o más porciones adicionales que pueden ser

5 cada una independientemente una porción de péptido, polipéptido o proteína, o una porción no peptídica (por ejemplo, un polialquilenglicol, un lípido, un carbohidrato). Por ejemplo, el ligando puede comprender además una porción que extiende la vida media como se describe en la presente (por ejemplo, una porción de polialquilenglicol, una porción que comprende albúmina, un

10 fragmento de albúmina o variante de albúmina, una porción que comprende transferrina, un fragmento de transferrina o variante de transferrina, una porción que se une a albúmina, o una porción que se une al receptor de Fc neonatal).

Compite: Como se refiere en la presente, el término “compite”

15 significa que la unión de un primer objetivo (por ejemplo, el TGFbetaRII) a su dominio de unión objetivo cognado (por ejemplo, dominio variable individual de inmunoglobulina), es inhibida en presencia de un segundo dominio de unión (por ejemplo, dominio variable individual de inmunoglobulina) que es específico para dicho objetivo cognado. Por ejemplo, la unión puede ser

20 inhibida estéricamente, por ejemplo, mediante el bloqueo físico de un dominio de unión o por la alteración de la estructura o el ambiente de un dominio de unión, tal que su afinidad o aidez por un objetivo es reducida. Véase el documento WO2006038027 para detalles de cómo llevar a cabo experimentos

de ELISA de competencia y experimentos de BIACORE™ de competencia para determinar la competencia entre el primer y segundo dominios de unión, cuyos detalles se incorporan en la presente como referencia para proveer una descripción explícita para su uso en la presente descripción. La descripción

5 incluye proteínas de unión al antígeno, específicamente dominios variables individuales, polipéptidos, ligandos y proteínas de fusión, que compiten con cualquiera de los dominios variables individuales de SEQ ID NO: 1-38. En una modalidad particular, se provee una proteína de unión al TGFbetaRII que compite con cualquiera de los dominios variables individuales de SEQ ID NO:

10 1-38, y tiene también una KD de 50 nM o menos para el TGFbetaRII. En una modalidad particular, la KD está entre 10 pM y 50 nM. En una modalidad particular, la KD está entre 10 pM y 10 nM. En una modalidad particular, la KD está entre 100 pM y 10 nM. En una modalidad particular, la KD es de aproximadamente 100 pM.

15 Señalización del TGFbeta: Convenientemente, el dominio variable individual, polipéptido o ligando de la descripción, puede neutralizar la señalización del TGFbeta a través del TGFbetaRII. Por el término “neutralizar”, se entiende que el efecto de señalización normal del TGFbeta es bloqueado, tal que la presencia del TGFbeta tiene un efecto neutro sobre la

20 señalización del TGFbetaRII. Métodos adecuados para medir un efecto de neutralización incluyen pruebas para la señalización del TGFbeta como se describen en la presente. En una modalidad, se observa neutralización como un % de inhibición de la actividad del TGFbeta en una prueba de señalización

del TGFbeta. En una modalidad, el dominio variable individual o polipéptido se une al dominio extracelular del TGFbetaRII, inhibiendo/bloqueando de esta manera la unión del TGFbeta al dominio extracelular del TGFbetaRII. Convenientemente, el dominio variable individual o polipéptido es útil en donde existe un exceso del TGFbeta biodisponible, y el dominio variable individual o polipéptido sirve para inhibir la actividad de señalización del TGFbeta biodisponible, a través de la inhibición de la unión del TGFbeta a su receptor cognado TGFbetaRII.

Como se usa en la presente, el término “antagonista del TGFbetaRII” o “antagonista anti-TGFbetaRII” o similares, se refiere a un agente (por ejemplo, una molécula, un compuesto) que se une al TGFbetaRII y puede inhibir una función (es decir, una o más funciones) del TGFbetaRII. Por ejemplo, un antagonista del TGFbetaRII puede inhibir la unión del TGFbeta al TGFbetaRII y/o inhibir la transducción de señales mediada a través del TGFbetaRII. Por consiguiente, procesos y respuestas celulares mediados por el TGFbeta pueden ser inhibidos con un antagonista del TGFbetaRII.

En una modalidad, el ligando (por ejemplo, dominio variable individual de inmunoglobulina) que se une al TGFbetaRII inhibe la unión del TGFbeta a un receptor TGFbetaRII con una concentración inhibidora 50 (IC50) que es $\leq$ aproximadamente 10 μ M, $\leq$ aproximadamente 1 μ M, $\leq$ aproximadamente 100 nM, $\leq$ aproximadamente 50 nM, $\leq$ aproximadamente 10 nM, $\leq$ aproximadamente 5 nM, $\leq$ aproximadamente 1 nM, $\leq$ aproximadamente

500 pM, $\leq$ aproximadamente 300 pM, $\leq$ aproximadamente 100 pM o $\leq$ aproximadamente 10 pM. En una modalidad particular, un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de la descripción tiene una IC50 de 15 μ M o menos. La IC50 se determina opcionalmente usando una prueba de unión al receptor del TGFbeta *in vitro*, o una prueba celular, tal como la prueba descrita en la presente.

Se contempla también que el ligando (por ejemplo, dominio variable individual de inmunoglobulina) inhibe opcionalmente las funciones inducidas por el TGFbetaRII en una prueba *in vitro* adecuada con una dosis de neutralización 50 (ND50) que es $\leq$ aproximadamente 10 μ M, $\leq$ aproximadamente 1 μ M, $\leq$ aproximadamente 100 nM, $\leq$ aproximadamente 50 nM, $\leq$ aproximadamente 10 nM, $\leq$ aproximadamente 5 nM, $\leq$ aproximadamente 1 nM, $\leq$ aproximadamente 500 pM, $\leq$ aproximadamente 300 pM, $\leq$ aproximadamente 100 pM, $\leq$ aproximadamente 10 pM, $\leq$ aproximadamente 1 pM, $\leq$ aproximadamente 500 fM, $\leq$ aproximadamente 300 fM, $\leq$ aproximadamente 100 fM, $\leq$ aproximadamente 10 fM. En una modalidad particular, un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de la descripción, logra más de 40% de neutralización del TGF- β .

“Ligando específico doble”: En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido o ligando de conformidad con la descripción, puede ser parte de un “ligando específico doble”, el cual se refiere a un ligando que comprende un primer sitio de unión al antígeno o epítipo (por ejemplo, primer dominio variable individual de inmunoglobulina) y

un segundo sitio de unión al antígeno o epítope (por ejemplo, segundo dominio variable individual de inmunoglobulina), en donde los sitios de unión o dominios variables son capaces de unirse a dos antígenos (por ejemplo, diferentes antígenos o dos copias del mismo antígeno) o dos epítopes en el mismo antígeno que no son normalmente unidos por una inmunoglobulina monoespecífica. Por ejemplo, los dos epítopes pueden estar en el mismo antígeno, pero no son el mismo epítope o están suficientemente adyacentes para ser unidos por un ligando monoespecífico. En una modalidad, los ligandos específicos dobles de conformidad con la descripción están compuestos de sitios de unión o dominios variables que tienen diferentes especificidades, y no contienen pares de dominio variables mutuamente complementarios (es decir, pares de V_H/V_L) que tienen la misma especificidad (es decir, no forman un sitio de unión unitario).

En una modalidad, un “ligando específico doble” puede unirse al TGFbetaRII y a otra molécula objetivo. Por ejemplo, otra molécula objetivo puede ser una molécula objetivo específica de tejidos, tal que el ligando específico doble de la descripción permite que un dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido anti-TGFbetaRII de conformidad con la descripción, sea dirigido hacia un tejido de interés. Dichos tejidos incluyen pulmón, hígado, etc.

Se proveen también multímeros de dAb multiespecíficos. Esto incluye un multímero de dAb que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con cualquier aspecto de la

descripción y uno o más dominios variables individuales, cada uno de los cuales se une a un diferente objetivo (por ejemplo, un objetivo diferente del TGFbetaRII). En una modalidad, se provee un multímero de dAb biespecífico, por ejemplo, un multímero de dAb que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con cualquier aspecto de la descripción, y uno o más dAbs que se unen a un segundo objetivo diferente. En una modalidad, se provee un multímero de dAb triespecífico.

Los ligandos de la descripción (por ejemplo, polipéptidos, dAbs y antagonistas) pueden ser formateados como una proteína de fusión que contiene un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que es fusionado directamente con un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina. Si se desea, dicho formato puede comprender además una porción que extiende la vida media. Por ejemplo, el ligando puede comprender un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que es fusionado directamente con un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que es fusionado directamente con un dominio variable individual de inmunoglobulina que se une a la albúmina de suero.

En general, la orientación de los dominios del polipéptido que tienen un sitio de unión con especificidad de unión por un objetivo, y si el ligando comprende un enlazador, es un asunto de elección de diseño. Sin embargo, algunas orientaciones, con o sin enlazadores, pueden proveer mejores características de unión que otras orientaciones. Todas las

orientaciones (por ejemplo, dAb1-enlazador-dAb2; dAb2-enlazador-dAb1) son abarcadas por la descripción, y son ligandos que contienen una orientación que provee las características de unión deseadas que pueden identificarse fácilmente mediante tamizado.

5 Los polipéptidos y dAbs de conformidad con la descripción, incluyendo monómeros, dímeros y trímeros de dAb, pueden ser enlazados a una región Fc de anticuerpo, comprendiendo un dominio C_H2 o C_H3 o ambos dominios C_H2 y C_H3, y opcionalmente una región de gozne. Por ejemplo, vectores que codifiquen para ligandos enlazados como una secuencia de
10 nucleótidos individual a una región Fc, pueden usarse para preparar dichos polipéptidos. En una modalidad, se provee una fusión dAb-Fc.

La descripción provee además dímeros, trímeros y polímeros de los monómeros de dAb mencionados anteriormente.

Objetivo: Como se usa en la presente, la frase “objetivo” se
15 refiere a una molécula biológica (por ejemplo, péptido, polipéptido, proteína, lípido, carbohidrato) a la cual un dominio de polipéptido que tiene un sitio de unión, puede unirse. El objetivo puede ser, por ejemplo, un objetivo intracelular (por ejemplo, una proteína intracelular objetivo), un objetivo soluble (por ejemplo, un objetivo secretado) o un objetivo de la superficie de la
20 célula (por ejemplo, una proteína de membrana, una proteína de receptor). En una modalidad, el objetivo es el TGFbetaRII. En otra modalidad, el objetivo es el dominio extracelular del TGFbetaRII.

Complementarios: Como se usa en la presente, el término

“complementarios” se refiere a cuando dos dominios de inmunoglobulina pertenecen a familias de estructuras que forman pares o grupos cognados o se derivan de dichas familias, y retienen esta característica. Por ejemplo, un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo son complementarios; dos dominios V_H no son complementarios, y dos dominios V_L no son complementarios. Pueden encontrarse dominios complementarios en otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, tales como los dominios $V\alpha$ y $V\beta$ (o γ y δ) del receptor de células T. Los dominios que son artificiales, tales como los dominios basados en andamios de proteína que no se unen a epítopes a menos que sean diseñados de esta manera, no son complementarios. Asimismo, dos dominios basados en (por ejemplo) un dominio de inmunoglobulina y un dominio de fibronectina, no son complementarios.

“Afinidad” y “avidez” son términos de la técnica que describen la fuerza de una interacción de unión. Con respecto a los ligandos de la descripción, la avidez se refiere a la fuerza de unión general entre los objetivos (por ejemplo, primer objetivo y segundo objetivo) en la célula y el ligando. La avidez es más que la suma de las afinidades individuales por los objetivos individuales.

Moléculas de ácido nucleico, vectores y células hospederas: La descripción provee también moléculas de ácido nucleico aisladas y/o recombinantes que codifican para ligandos (dominios variables individuales, proteínas de fusión, polipéptidos, ligandos específicos dobles y ligandos

multiespecíficos), como se describe en la presente.

Los ácidos nucleicos referidos en la presente como “aislados”, son ácidos nucleicos que han sido separados de los ácidos nucleicos del ADN genómico o ARN celular de su fuente de origen (por ejemplo, como existen en
5 las células o en una mezcla de ácidos nucleicos tal como una colección), e incluyen los ácidos nucleicos obtenidos mediante los métodos descritos en la presente u otros métodos adecuados, incluyendo ácidos nucleicos esencialmente puros, ácidos nucleicos producidos mediante síntesis química, mediante combinaciones de métodos biológicos y químicos, y ácidos
10 nucleicos recombinantes que son aislados (véase, por ejemplo, Daugherty, B. L. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A. P. y J. S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)).

Los ácidos nucleicos referidos en la presente como “recombinantes”, son ácidos nucleicos que han sido producidos mediante la
15 metodología de ADN recombinante, incluyendo aquellos ácidos nucleicos que se generan mediante procedimientos que dependen de un método de recombinación artificial, tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y/o la clonación en un vector usando enzimas de restricción.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico aislado y/o
20 recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido o ligando, como se describe en la presente, en donde dicho ligando comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos

aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 91%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 93%, por lo menos aproximadamente 94%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos
5 aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos de un dAb que se une al TGFbetaRII descrito en la presente, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de SEQ ID NOS: 1-38. La identidad de secuencia de nucleótidos
10 puede determinarse sobre la longitud entera de la secuencia de nucleótidos que codifica para el dAb anti-TGFbetaRII seleccionado. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste de una secuencia de ácido nucleico por lo menos 80% idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 39-66. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste de una
15 secuencia de ácido nucleico de cualquiera de SEQ ID NO: 39-76.

Las modalidades de la descripción proveen también secuencias de nucleótidos optimizadas en codones que codifican para polipéptidos y dominios variables como se describe en la presente, por ejemplo, optimizados para expresión en células de bacterias, mamíferos o levaduras.

20 La descripción provee también un vector que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante de la descripción. En ciertas modalidades, el vector es un vector de expresión que comprende uno o más elementos de control de la expresión o secuencias que están enlazadas

operablemente al ácido nucleico recombinante de la descripción. La descripción provee también una célula hospedera recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante o vector de la descripción. Vectores adecuados (por ejemplo, plásmidos, fagémidos),
5 elementos de control de la expresión, células hospederas y métodos para producir células hospederas recombinantes de la descripción, son bien conocidos en la técnica, y ejemplos de ellos se describen adicionalmente en la presente.

Vectores de expresión adecuados pueden contener muchos
10 componentes, por ejemplo, un origen de replicación, un gen marcador seleccionable, uno o más elementos de control de la expresión, tales como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, promotor, intensificador, terminador) y/o una o más señales de traducción, una secuencia de señal o secuencia guía, y similares. Los elementos de control de la expresión y una
15 secuencia de señal, si están presentes, pueden ser provistos por el vector u otra fuente. Por ejemplo, las secuencias de control de la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico clonado que codifica para una cadena de anticuerpo, pueden usarse para dirigir la expresión.

Puede proveerse un promotor para expresión en una célula
20 hospedera deseada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede ser enlazado operablemente a un ácido nucleico que codifique para un anticuerpo, cadena de anticuerpo o porción de la misma, de modo que dirija la transcripción del ácido nucleico. Está

disponible una variedad de promotores adecuados para hospederos procarióticos (por ejemplo, lac, tac, T3, promotores T7 para *E. coli*) y eucarióticos (por ejemplo, promotor temprano o tardío del virus simiano 40, promotor de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, 5 promotor de citomegalovirus, promotor tardío de adenovirus).

Además, los vectores de expresión comprenden típicamente un marcador seleccionable para la selección de células hospederas que poseen el vector y, en el caso de un vector de expresión replicable, un origen de replicación. Genes que codifican para productos que confieren resistencia a 10 antibióticos o fármacos son marcadores seleccionables comunes, y pueden usarse en células procarióticas (por ejemplo, gen de lactamasa (para resistencia a ampicilina), gen Tet para resistencia a tetraciclina) y eucarióticas (por ejemplo, genes de resistencia a neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina). Los genes marcadores de 15 dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de hospederos. Los genes que codifican para el producto génico de marcadores auxotróficos del hospedero (por ejemplo, LEU2, URA3, HIS3), se usan con frecuencia como marcadores seleccionables en levaduras. Se contempla también el uso de vectores virales (por ejemplo, baculovirus) o de 20 fagos, y vectores que son capaces de exhibir integración en el genoma de la célula hospedera, tales como los vectores retrovirales. Vectores de expresión adecuados para expresión en células de mamífero y células procarióticas (*E. coli*), células de insecto (*Drosophila*, células S2 de Schnieder, Sf9) y levaduras

(*P. methanolica*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*), son bien conocidos en la técnica.

Células hospederas adecuadas pueden ser procarióticas, incluyendo células bacterianas tales como *E. coli*, *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; células eucarióticas, tales como células de hongos o levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Aspergillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*) u otras células eucarióticas inferiores, y células de eucariontes superiores tales como aquellas de insectos (por ejemplo, *Drosophila*, células S2 de Schnieder, células Sf9 de insecto (documento WO 94/26087 (O'Connor)), mamíferos (por ejemplo, células COS, tales como COS-1 (No. de acceso de la ATCC CRL-1650) y COS-7 (No. de acceso de la ATCC CRL-1651), y células CHO (por ejemplo, No. de acceso de la ATCC CRL-9096, CHO DG44 (Urlaub, G. y Chasin, LA., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7): 4216-4220 (1980))), 293 (No. de acceso de la ATCC CRL-1573), HeLa (No. de acceso de la ATCC CCL-2), CV1 (No. de acceso de la ATCC CCL-70), WOP (Dailey, L., *et al.*, J. Virol., 54: 739-749 (1985), 3T3, 293T (Pear, W. S., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90: 8392-8396 (1993)), NS0, SP2/0, HuT 78, similares, o plantas (por ejemplo, tabaco). (Véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. *et al.*, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons Inc. (1993). En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula hospedera aislada y no es parte de un organismo multicelular (por ejemplo, planta o animal). En ciertas modalidades, la célula hospedera es una célula hospedera no de humano.

La descripción provee también un método para producir un ligando (por ejemplo, ligando específico doble, ligando multiespecífico) de la descripción, que comprende mantener una célula hospedera recombinante que comprenda un ácido nucleico recombinante de la descripción bajo
5 condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante, por lo cual el ácido nucleico recombinante es expresado y un ligando es producido. En algunas modalidades, el método comprende además aislar el ligando.

Se hace referencia al documento WO200708515, página 161,
10 renglón 24 a página 189, renglón 10, para detalles de la descripción que son aplicables a las modalidades de la presente descripción. Esta descripción se incorpora de esta manera en la presente como referencia, como si apareciera explícitamente en el texto de la presente descripción y se refiriera a las modalidades de la presente descripción, y provee apoyo explícito para la
15 descripción para ser incorporada en las reivindicaciones más adelante. Esto incluye la descripción presentada en el documento WO200708515, página 161 renglón 24, a página 189 renglón 10, que provee detalles de la “preparación de ligandos basados en inmunoglobulina”, “sistemas de vectores de colección”, “construcción de colecciones”, “combinación de dominios
20 variables individuales”, “caracterización de ligandos”, “estructura de los ligandos”, “esqueletos”, “andamios de proteína”, “andamios para su uso en la construcción de ligandos”, “diversificación de la secuencia canónica” y “composiciones terapéuticas y de diagnóstico y usos de las mismas”, así

como definiciones de “enlazado operablemente”, “no afectado”, “prevención”, “supresión”, “tratamiento”, “enfermedad alérgica”, “enfermedad mediada por Th2”, “dosis terapéuticamente efectiva” y “efectiva”.

La frase “vida media”, se refiere al tiempo transcurrido para que

5 la concentración del dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido o ligando en suero, se reduzca en 50%, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del ligando y/o la depuración o el secuestro del ligando por mecanismos naturales. Los ligandos de la descripción pueden ser estabilizados *in vivo*, y su vida media puede ser incrementada por la unión a

10 moléculas que resisten a la degradación y/o la depuración o el secuestro. Típicamente, dichas moléculas son proteínas de ocurrencia natural que tienen por sí mismas una larga vida media *in vivo*. La vida media de un ligando se incrementa, si su actividad funcional persiste, *in vivo*, por un período más largo que un ligando similar que no es específico para la molécula que

15 incrementa la vida media. De esta manera, un ligando específico para la HSA y una molécula objetivo se compara con el mismo ligando en donde la especificidad por la HSA no está presente, es decir, no se une a la HSA, pero se une a otra molécula. Típicamente, la vida media es incrementada en 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más. Son posibles incrementos en la escala de 2x, 3x,

20 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x o más, de la vida media. En forma alternativa, o además, son posibles incrementos en la escala de hasta 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x o 150x de la vida media.

Formatos: La vida media incrementada puede ser útil en

aplicaciones de las inmunoglobulinas *in vivo*, especialmente anticuerpos y más especialmente fragmentos de anticuerpo de pequeño tamaño. Dichos fragmentos (Fvs, Fvs unidos por disulfuro, Fabs, scFvs, dAbs) son en general rápidamente depurados del cuerpo. Los dAbs, polipéptidos o ligandos de
5 conformidad con la descripción, pueden ser adaptados para proveer una vida media incrementada *in vivo*, y en consecuencia tiempos de persistencia más largos de la actividad funcional del ligando, en el cuerpo.

Métodos para el análisis farmacocinético y la determinación de la vida media del ligando, serán bien conocidos por los expertos en la técnica.
10 Pueden encontrarse detalles en Kenneth, A *et al*: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, y en Peters *et al*., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). Se hace referencia también a “Pharmacokinetics”, M Gibaldi y D Perron, publicado por Marcel Dekker, segunda edición revisada (1982), que describe parámetros de
15 farmacocinética tales como las vidas medias t_{α} y t_{β} , y el área bajo la curva (AUC).

Pueden determinarse las vidas medias ($t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$) y el AUC, a partir de una curva de concentración del ligando en el suero contra el tiempo. Puede usarse el paquete de análisis WINNONLIN™ (disponible de
20 Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA), por ejemplo, para diseñar la curva. En una primera fase (la fase alfa), el ligando está sufriendo principalmente distribución en el paciente, con cierta eliminación. Una segunda fase (fase beta), es la fase terminal cuando el ligando ha sido

distribuido y la concentración en suero está disminuyendo conforme el ligando es depurado del paciente. La vida media t_{α} es la vida media de la primera fase, y la vida media t_{β} es la vida media de la segunda fase. De esta manera, en una modalidad, la presente descripción provee un ligando o una
5 composición que comprende un ligando de conformidad con la descripción que tiene una vida media t_{α} en la escala de 15 minutos o más. En una modalidad, el extremo inferior de la escala es 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o en forma alternativa, un ligando o composición de
10 conformidad con la descripción tendrá una vida media t_{α} en la escala de hasta e incluyendo 12 horas. En una modalidad, el extremo superior de la escala es 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 horas. Un ejemplo de una escala adecuada es 1 a 6 horas, 2 a 5 horas o 3 a 4 horas.

En una modalidad, la presente descripción provee un ligando
15 (polipéptido, dAb o antagonista) o una composición que comprende un ligando de conformidad con la descripción, que tiene una vida media t_{β} en la escala de aproximadamente 2.5 horas o más. En una modalidad, el extremo inferior de la escala es aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7
20 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas o aproximadamente 12 horas. Además, o en forma alternativa, un ligando o composición de conformidad con la descripción tiene una vida media t_{β} en la escala de hasta e incluyendo 21 días. En una modalidad, el extremo superior

de la escala es aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 15 días o aproximadamente 20 días. En una modalidad, un ligando o composición de conformidad con la descripción tendrá una vida media t_{β} en la escala de aproximadamente 12 a 5 aproximadamente 60 horas. En otra modalidad, estará en la escala de aproximadamente 12 a aproximadamente 48 horas. En otra modalidad más, estará en la escala de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 horas.

Además, o en forma alternativa a los criterios anteriores, la presente descripción provee un ligando o composición que comprende un 10 ligando de conformidad con la descripción, que tiene un valor de AUC (área bajo la curva) en la escala de aproximadamente 1 mg•min/ml o más. En una modalidad, el extremo inferior de la escala es aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, 15 aproximadamente 30, aproximadamente 100, aproximadamente 200 o aproximadamente 300 mg•min/ml. Además, o en forma alternativa, un ligando o composición de conformidad con la descripción tiene un AUC en la escala de hasta aproximadamente 600 mg•min/ml. En una modalidad, el extremo superior de la escala es aproximadamente 500, aproximadamente 400, 20 aproximadamente 300, aproximadamente 200, aproximadamente 150, aproximadamente 100, aproximadamente 75 o aproximadamente 50 mg•min/ml. En una modalidad, un ligando de conformidad con la descripción tendrá un AUC en la escala seleccionada del grupo que consiste de lo

siguiente: aproximadamente 15 a aproximadamente 150 mg•min/ml, aproximadamente 15 a aproximadamente 100 mg•min/ml, aproximadamente 15 a aproximadamente 75 mg•min/ml y aproximadamente 15 a aproximadamente 50 mg•min/ml.

5 Los polipéptidos y dAbs de la descripción y los antagonistas que comprenden éstos, pueden ser formateados para que tengan un tamaño hidrodinámico más grande, por ejemplo, mediante la unión a un grupo de PEG, albúmina de suero, transferrina, receptor de transferrina o por lo menos la porción de unión a transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo, o
10 mediante la conjugación con un dominio de anticuerpo, por ejemplo, polipéptidos, dAbs y antagonistas formateados como un fragmento más grande de unión al antígeno de un anticuerpo, o como un anticuerpo (por ejemplo, formateados como un Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG o scFv).

Como se usa en la presente, el “tamaño hidrodinámico” se
15 refiere al tamaño aparente de una molécula (por ejemplo, una molécula de proteína, ligando) basado en la difusión de la molécula a través de una solución acuosa. La difusión o el movimiento de una proteína a través de la solución puede ser procesado para derivar un tamaño aparente de la proteína, en donde el tamaño es dado por el “radio de Stokes” o “radio hidrodinámico”
20 de la partícula de proteína. El “tamaño hidrodinámico” de una proteína depende de la masa y la forma (conformación), de modo que dos proteínas que tienen la misma masa molecular pueden tener diferentes tamaños hidrodinámicos con base en la conformación general de la proteína.

El tamaño hidrodinámico de los ligandos (por ejemplo, monómeros y multímeros de dAb) de la descripción, puede determinarse usando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de filtración en gel para determinar el tamaño
5 hidrodinámico de un ligando. Matrices de filtración en gel adecuadas para determinar los tamaños hidrodinámicos de los ligandos, tales como matrices de agarosa entrelazadas, son bien conocidos y están fácilmente disponibles.

El tamaño del formato de un ligando (por ejemplo, el tamaño de una porción de PEG unida a un monómero de dAb) puede hacerse variar,
10 dependiendo de la aplicación deseada. Por ejemplo, en donde se pretenda que el ligando abandone la circulación y entre en los tejidos periféricos, es deseable mantener bajo el tamaño hidrodinámico del ligando para facilitar la extravasación del torrente sanguíneo. En forma alternativa, en donde se desee que el ligando permanezca en la circulación sistémica por un período
15 más largo, el tamaño del ligando puede incrementarse, por ejemplo, mediante formateo como una proteína tipo Ig.

La extensión de la vida media elige como objetivo un antígeno o epítotope que incrementa la vida media *in vivo*. El tamaño hidrodinámico de un ligando y su vida media en suero, puede incrementarse también por
20 conjugación o asociación con un polipéptido que se une al TGFbetaRII, dAb o ligando de la descripción con un dominio de unión (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno o epítotope que incrementa la vida media *in vivo*, como se describe en la presente. Por ejemplo, el agente

de unión al TGFbetaRII (por ejemplo, polipéptido) puede ser conjugado o enlazado con un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de receptor de Fc anti-neonatal o de albúmina anti-suero, por ejemplo, un dAb de receptor de Fc anti-SA o anti-neonatal, Fab, Fab' o scFv, o con un aficuerpo de receptor de Fc anti-neonatal o aficuerpo anti-SA o un avímero anti-SA, o un dominio de unión anti-SA que comprenda un andamio seleccionado de, pero no limitado a, el grupo que consiste de CTLA-4, lipocalina, SpA, un aficuerpo, un avímero, GroEl y fibronectina (véase el documento WO2008096158 para una descripción de estos dominios de unión, cuyos dominios y sus secuencias se incorporan en la presente como referencia y forman parte de la descripción del presente texto). La conjugación se refiere a una composición que comprende un polipéptido, dAb o antagonista de la descripción que es unido (covalentemente o no covalentemente) a un dominio de unión tal como un dominio de unión que se une a la albúmina de suero.

Típicamente, un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* es un polipéptido que ocurre naturalmente *in vivo*, y el cual resiste la degradación o remoción por mecanismos endógenos que remueven el material no deseado del organismo (por ejemplo, humano). Por ejemplo, un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* puede seleccionarse de proteínas de la matriz extracelular, proteínas encontradas en la sangre, proteínas encontradas en la barrera hemoencefálica o en el tejido neural, proteínas localizadas hacia el riñón, hígado, pulmón, corazón, piel o hueso, proteínas del estrés, proteínas específicas de enfermedad, o proteínas

implicadas en el transporte de Fc. Polipéptidos adecuados se describen, por ejemplo, en el documento WO2008/096158.

Dicho procedimiento puede usarse también para el suministro dirigido de un dominio variable individual, polipéptido o ligando de conformidad con la descripción, hacia un tejido de interés. En una modalidad, se provee el suministro dirigido de un dominio variable individual de alta afinidad de conformidad con la descripción.

dAbs que se unen a la albúmina de suero: La descripción en una modalidad provee un polipéptido o antagonista (por ejemplo, ligando específico doble que comprende un dAb anti-TGFbetaRII (un primer dAb)) que se une al TGFbetaRII, y un segundo dAb que se une a la albúmina de suero (SA), el segundo dAb uniéndose a la SA. Detalles de ligandos específicos dobles se encuentran en los documentos WO03002609, WO04003019, WO2008096158 y WO04058821.

En modalidades particulares de los ligandos y antagonistas, el dAb se une a la albúmina de suero humano y compite por la unión a la albúmina, con un dAb seleccionado del grupo que consiste de cualquiera de las secuencias de dAb descritas en el documento WO2004003019 (cuyas secuencias y su contraparte de ácido nucleico se incorporan en la presente como referencia y forman parte de la descripción del presente texto), cualquiera de las secuencias de dAb descritas en el documento WO2007080392 (cuyas secuencias y su contraparte de ácido nucleico se incorporan en la presente como referencia y forman parte de la descripción del

presente texto), cualquiera de las secuencias de dAb descritas en el documento WO2008096158 (cuyas secuencias y su contraparte de ácido nucleico se incorporan en la presente como referencia y forman parte de la descripción del presente texto).

5 En ciertas modalidades, el dAb se une a la albúmina de suero humano y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 85%, o por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%, o por lo menos aproximadamente 96%, o por lo menos aproximadamente 97%, o
10 por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos de un dAb descrito en cualquiera de los documentos WO2004003019, WO2007080392 o WO2008096158. Por ejemplo, el dAb que se une a la albúmina de suero humano puede comprender una secuencia de aminoácidos
15 que tiene por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%, o por lo menos aproximadamente 96%, o por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de estos dAbs. En ciertas
20 modalidades, el dAb se une a la albúmina de suero humano y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 85%, o por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%, o por lo menos aproximadamente

96%, o por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de estos dAbs.

5 En modalidades más particulares, el dAb es un dAb de V_k que se une a la albúmina de suero humano. En modalidades más particulares, el dAb es un dAb de V_H que se une a la albúmina de suero humano.

Tipos de V_{HH} de camélido adecuados que se unen a la albúmina de suero, incluyen aquellos descritos en el documento WO2004041862
10 (Ablynx N.V.) y en el documento WO2007080392 (cuyas secuencias de V_{HH} y su contraparte de ácido nucleico se incorporan en la presente como referencia y forman parte de la descripción del presente texto). En ciertas modalidades, el V_{HH} de camélido se une a la albúmina de suero humano y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 80%, o
15 por lo menos aproximadamente 85%, o por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%, o por lo menos aproximadamente 96%, o por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos, con aquellas secuencias descritas en el
20 documento WO2007080392 o cualquiera de SEQ ID NOS: 518-534, estos números de secuencia correspondiendo a aquellos citados en el documento WO2007080392 o WO 2004041862.

En una modalidad alternativa, el antagonista o ligando

comprende una porción de unión específica para el TGFbetaRII (por ejemplo, el TGFbetaRII de humano), en donde la porción comprende secuencias no de inmunoglobulina como se describe en el documento WO2008096158, en donde la descripción de estas porciones de unión, sus métodos de producción y selección (por ejemplo, de colecciones diversas) y sus secuencias, se incorporan en la presente como referencia como parte de la descripción del presente texto).

Conjugación con una porción que extiende la vida media (por ejemplo, albúmina): En una modalidad, una (una o más) porción que extiende la vida media (por ejemplo, albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de la misma) es conjugada o asociada con el polipéptido que se une al TGFbetaRII, dAb o antagonista de la descripción. Ejemplos de albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina adecuados para su uso en un formato de unión al TGFbetaRII se describen en el documento WO2005077042, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia y forma parte de la descripción del presente texto.

Otros ejemplos de albúmina, fragmentos y análogos de la misma adecuados para su uso en un formato de unión al TGFbetaRII se describen en el documento WO 03076567, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia y el cual forma parte de la descripción del presente texto.

En donde una (una o más) porción que extiende la vida media (por ejemplo, albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de la misma) se usa para formatear los polipéptidos que se unen al TGFbetaRII, dAbs y

antagonistas de la descripción, puede ser conjugada usando cualquier método adecuado, tal como mediante fusión directa con la porción que se une al TGFbetaRII (por ejemplo, dAb anti-TGFbetaRII), por ejemplo, usando una construcción de nucleótido individual que codifique para una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión es codificada como una cadena de polipéptido individual con la porción que extiende la vida media localizada N- o C-terminalmente hacia la porción que se une al TGFbetaRII. En forma alternativa, puede lograrse la conjugación usando un enlazador de péptidos entre las porciones, por ejemplo, un enlazador de péptidos como se describe en el documento WO03076567 o WO2004003019 (estas descripciones de enlazador siendo incorporadas en la presente como referencia en la presente descripción, para proveer ejemplos para su uso en la presente descripción).

Conjugación con PEG: En otras modalidades, la porción que extiende la vida media es una porción de polietilenglicol. En una modalidad, el antagonista comprende (opcionalmente consiste de) un dominio variable individual de la descripción enlazado a una porción de polietilenglicol (opcionalmente, en donde dicha porción tiene un tamaño de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 kDa, opcionalmente PEG lineal o ramificado de aproximadamente 40 kDa). Se hace referencia al documento WO04081026 para más detalles sobre la PEGilación de dAbs y porciones de unión. En una modalidad, el antagonista consiste de un monómero de dAb enlazado a un PEG, en donde el monómero de dAb es un dominio variable individual de conformidad con la descripción.

En otra modalidad, un dominio variable individual, ligando o polipéptido de conformidad con la descripción, puede ser enlazado a una porción de toxina o toxina.

Resistencia a proteasas: Los dominios variables individuales, polipéptidos o ligandos de conformidad con la descripción, pueden ser modificados para mejorar su resistencia a la degradación por proteasas. Como se usa en la presente, un péptido o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo de dominio (dAb)) que es “resistente a la degradación por proteasas”, no es sustancialmente degradado por una proteasa cuando se incuba con la proteasa bajo condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa. Un polipéptido (por ejemplo, un dAb) no es sustancialmente degradado cuando no más de aproximadamente 25%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 15%, no más de aproximadamente 14%, no más de aproximadamente 13%, no más de aproximadamente 12%, no más de aproximadamente 11%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 9%, no más de aproximadamente 8%, no más de aproximadamente 7%, no más de aproximadamente 6%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 4%, no más de aproximadamente 3%, no más de aproximadamente 2%, no más de aproximadamente 1%, o sustancialmente nada de la proteína es degradada por la proteasa después de la incubación con la proteasa por aproximadamente una hora a una temperatura adecuada para la actividad de la proteasa, por ejemplo, a 37 o 50 °C. La degradación de

la proteína puede evaluarse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante SDS-PAGE o mediante una prueba funcional (por ejemplo, unión al ligando), como se describe en la presente.

Métodos para generar dAbs con resistencia mejorada a las proteasas se describen, por ejemplo, en el documento WO2008149143. En una modalidad, el dominio variable individual, polipéptido o ligando de conformidad con la descripción, es resistente a la degradación por la leucozima y/o tripsina. Los polipéptidos, dominios variables individuales de inmunoglobulina y ligandos de la descripción, pueden ser resistentes a una o más de las siguientes enzimas: serina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasas, tiol proteasas, metaloproteasa de matriz, carboxipeptidasa (por ejemplo, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, elastasa, leucozima, pancreatina, trombina, plasmina, catepsinas (por ejemplo, catepsina G), proteinasa (por ejemplo, proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimosina, enteropeptidasa, caspasa (por ejemplo, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficaína, clostripaína, actinidaína, bromelaína y separasa. En modalidades particulares, la proteasa es tripsina, elastasa o leucozima. La proteasa puede ser provista también por un extracto biológico, homogenizado biológico o preparación biológica. Los polipéptidos, dominios variables individuales de inmunoglobulina y ligandos como se describe en la presente, pueden seleccionarse en presencia de proteasas del pulmón, de modo que dichos polipéptidos, dominios variables individuales de

inmunoglobulina y ligandos sean resistentes a dichas proteasas del pulmón. En una modalidad, la proteasa es una proteasa encontrada en el esputo, moco (por ejemplo, moco gástrico, moco nasal, moco bronquial), lavado broncoalveolar, homogenizado de pulmón, extracto de pulmón, extracto pancreático, fluido gástrico o saliva. En una modalidad, la proteasa es una encontrada en los ojos y/o las lágrimas. Ejemplos de dichas proteasas encontradas en el ojo incluyen caspasas, calpaínas, metaloproteasas de matriz, desintegrina, metaloproteinasas (por ejemplo ADAMs – una desintegrina y metaloproteinasa) y ADAM con motivos de trombospondina, los proteosomas, activador de plasminógeno tisular, secretasas, catepsina B y D, cistatina C, serina proteasa PRSS1, y vía del proteosoma de ubiquitina (UPP). En una modalidad, la proteasa es una proteasa no bacteriana. En una modalidad, la proteasa es una proteasa de animal, por ejemplo mamífero, por ejemplo humano. En una modalidad, la proteasa es una proteasa del tracto GI, o una proteasa del tejido pulmonar, por ejemplo, una proteasa del tracto GI o una proteasa del tejido pulmonar encontrada en humanos. Dicha proteasa enlistada en la presente puede usarse también en los métodos descritos, por ejemplo, en el documento WO2008149143, que incluye la exposición de un repertorio de colección para una proteasa.

Estabilidad: En un aspecto de la descripción, los polipéptidos, dominios variables individuales, dAbs, ligandos, composiciones o formulaciones de la descripción, son sustancialmente estables después de incubación (a una concentración de polipéptido o dominio variable de 1 mg/ml)

a 37 a 50°C por 14 días en regulador de pH de Britton Robinson o PBS. En una modalidad, por lo menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% del polipéptido, antagonista o dominio variable, etc., continúa estando no agregado después de dicha incubación a 37°C. En una

5 modalidad, por lo menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% del polipéptido o dominio variable, continúa siendo monomérico después de dicha incubación a 37°C.

En una modalidad, por lo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98

10 o 99% del polipéptido, antagonista o dominio variable, continúa estando no agregado después de dicha incubación a 50°C. En una modalidad, por lo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% del polipéptido o dominio variable, continúa siendo monomérico después de dicha incubación a 50°C.

15 En una modalidad, ninguna agregación de los polipéptidos, dominios variables o antagonistas se observa después de cualquiera de dichas incubaciones. En una modalidad, el punto isoeléctrico (pI) del polipéptido o dominio variable se mantiene sin cambios o sustancialmente sin cambios después de incubación a 37°C a una concentración de polipéptido o dominio variable de 1 mg/ml en

20 regulador de pH de Britton-Robinson. En un aspecto de la descripción, los polipéptidos, dominios variables, antagonistas, composiciones o formulaciones de la descripción son sustancialmente estables después de incubación (a una concentración de polipéptido o dominio variable de 100 mg/ml) a 4°C por 7

días en regulador de pH de Britton Robinson o PBS a un pH de 7 a 7.5 (por ejemplo, a pH 7 o pH 7.5). En una modalidad, por lo menos 95, 95.5, 96, 96.5, 97, 97.5, 98, 98.5, 99 o 99.5% del polipéptido, antagonista o dominio variable continua estando no agregado después de dicha incubación. En una

5 modalidad, por lo menos 95, 95.5, 96, 96.5, 97, 97.5, 98, 98.5, 99 o 99.5% del polipéptido o dominio variable continúa siendo monomérico después de dicha incubación. En una modalidad, ninguna agregación de los polipéptidos, dominios variables o antagonistas se observa después de cualquiera de dichas incubaciones.

10 En un aspecto de la descripción, los polipéptidos, dominios variables, antagonistas, composiciones o formulaciones de la descripción, son sustancialmente estables después de nebulización (por ejemplo, a una concentración de polipéptido o dominio variable de 40 mg/ml) por ejemplo, a temperatura ambiente, 20°C o 37°C, por 1 hora, por ejemplo con un

15 nebulizador de chorro, por ejemplo, en una copa Pari LC+. En una modalidad, por lo menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95.5, 96, 96.5, 97, 97.5, 98, 98.5, 99 o 99.5% del polipéptido, antagonista o dominio variable, continúa estando no agregado después de dicha nebulización. En una modalidad, por lo menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,

20 94, 95, 95.5, 96, 96.5, 97, 97.5, 98, 98.5, 99 o 99.5% del polipéptido o dominio variable, continúa siendo monomérico después de dicha nebulización. En una modalidad, ninguna agregación de los polipéptidos, dominios variables o antagonistas, se observa después de dicha nebulización.

Forma monomérica: En una modalidad, se identifica que el dAb de la presente descripción es de preferencia monomérico. Convenientemente, la descripción provee un monómero (sustancialmente) puro. En una modalidad, el dAb es un monómero por lo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 5 90%, 95%, 98% o 99% puro o 100% puro. Para determinar si los dAbs son monoméricos o forman oligómeros de mayor orden en solución, pueden analizarse mediante SEC-MALLS. La SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser de ángulos múltiples), es una técnica no invasiva para la caracterización de las macromoléculas en solución, 10 que es bien conocida por los expertos en la técnica. En resumen, se separan proteínas (a concentración de 1 mg/mL en regulador de pH de PBS de Dulbecco) de acuerdo con sus propiedades hidrodinámicas, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (columna: TSK3000; S200). Después de la separación, la propensión de la proteína para dispersar luz se mide 15 usando un detector de dispersión de luz láser de ángulos múltiples (MALLS). La intensidad de la luz dispersa mientras la proteína pasa a través del detector, se mide como una función del ángulo. Esta medición tomada en conjunto con la concentración de proteína determinada usando el detector del índice de refracción (RI), permite el cálculo de la masa molar usando 20 ecuaciones apropiadas (parte integral del software de análisis Astra v.5.3.4.12).

Uso terapéutico: La descripción provee un método para el tratamiento, supresión o prevención de enfermedades asociadas con la

señalización del TGFbeta. En una modalidad, dicha enfermedad puede ser causada o contribuida por la señalización disregulada del TGFbeta, por la sobreexpresión del TGFbeta, o por los altos niveles del TGFbeta biodisponible. Enfermedades asociadas con la señalización del TGFbeta

5 incluyen enfermedades relacionadas con la fibrosis de varios tejidos, tales como fibrosis pulmonar que incluye fibrosis pulmonar idiopática (IPF) y otra enfermedad pulmonar intersticial tal como síndrome de sufrimiento respiratorio agudo (ARDS), fibrosis del hígado que incluye cirrosis y hepatitis crónica, artritis reumatoide, trastornos oculares, condiciones vasculares tales como

10 restenosis, fibrosis de la piel que incluye queloide de la piel y cicatrización después de la curación de heridas y contractura de Dupuytren, y del riñón tales como nefritis, fibrosis renal y nefrosclerosis, o una condición vascular tal como restenosis. Otras enfermedades asociadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades vasculares tales como hipertensión, pre-

15 eclampsia, telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (HHT1), HHT2, hipertensión arterial pulmonar, aneurismas aórticos, síndrome de Marfan, trastorno de aneurisma familiar, síndrome de Loeys-Dietz y síndrome de tortuosidad arterial (ATS). Otras enfermedades asociadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades del sistema musculoesquelético tales

20 como distrofia muscular de Duchenne y fibrosis muscular. Otras enfermedades asociadas con la señalización del TGFbeta incluyen cáncer tal como cáncer de colon, gástrico y pancreático, así como glioma y NSCLC. Además, la descripción provee métodos para elegir como objetivo el cáncer,

por ejemplo, modulando la señalización del TGFbeta en la angiogénesis tumoral o a través del tratamiento del estroma canceroso. Otras enfermedades o condiciones incluyen aquellas relacionadas con la cicatrización de tejidos. Otras enfermedades incluyen enfermedades pulmonares tales como EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), enfermedades hepáticas tales como insuficiencia hepática (por ejemplo, hepatitis viral, por alcohol, por obesidad, por trastorno autoinmune, de tipo metabólico, de tipo obstructivo), enfermedades renales que incluyen insuficiencia renal (por ejemplo diabetes, hipertensión), cardiomiopatía hipertrófica, rechazo de trasplante (pulmón/hígado/riñón) y cicatrización hipertrófica y queloide.

La “fibrosis” es el resultado del exceso de deposición de componentes de la matriz extracelular tales como colágena que causa crecimiento excesivo, cicatrización y/o endurecimiento de los tejidos.

15 “Fibrosis de la piel”: La fibrosis cutánea abarca una variedad de trastornos humanos con diferente etiología, pero con una disregulación común del metabolismo del tejido conectivo, en particular de los fibroblastos dérmicos. Ejemplos específicos de fibrosis cutánea incluyen enfermedad queloide, cicatrices hipertróficas (HS) y esclerodermia. La enfermedad queloide y las cicatrices hipertróficas, aunque no son subgrupos de la misma
20 condición, son el resultado de la cicatrización después de la curación de la herida, extendiéndose los queloides más allá del sitio original de la herida, mientras que la cicatriz hipertrófica está constreñida dentro de los márgenes

de la herida original. Sin embargo, la esclerodermia se usa para describir la fibrosis de la piel en la esclerosis sistémica, que es una condición sistémica que resulta en fibrosis de órganos múltiples. En una modalidad, el dominio variable, ligando, proteína de fusión o polipéptido como se describe en la presente, se usa para prevenir o tratar la enfermedad queloide, las cicatrices hipertróficas o la esclerodermia.

Los “queloides” son crecimientos excesivos fibrosos en sitios de lesión cutánea que se forman como resultado de un proceso anormal de curación de la herida en individuos genéticamente susceptibles y, a diferencia de las cicatrices normales, no exhiben regresión. Predominantemente observada en los pacientes con piel oscuramente pigmentada, la “enfermedad queloide” es un tumor fibroproliferativo dérmico benigno exclusivo de los humanos que nunca llega a ser maligno.

La “contractura de Dupuytren” es una formación localizada de tejido cicatrizal bajo la piel de la palma de la mano. La cicatrización se acumula en un tejido (fascia) que normalmente cubre los tendones que jalan los dedos para el agarre. Conforme la contractura de Dupuytren progresa, una mayor parte de la fascia llega a ser engrosada y acortada, resultando en contractura de la mano por flexión en donde los dedos se doblan hacia la palma de la mano y no pueden ser completamente extendidos (enderezados), resultando en casos extremos en pérdida del uso de la mano.

Ocurre cicatrización después de cirugía, lesión o trauma de tejidos u órganos dentro del cuerpo. Es una consecuencia de los mecanismos

de reparación que hacen que la matriz extracelular reemplace el tejido normal faltante. La piel representa el tejido lesionado con más frecuencia que resulta en cicatrización dérmica, lo cual puede resultar en consecuencias adversas que incluyen: pérdida de la función; contractura; y estética precaria que puede tener efectos psicológicos para quien la sufre. Las cicatrices pueden definirse como “una alteración macroscópica de la estructura y función normal de la arquitectura de la piel, que resulta del producto final de la curación de la herida” (Fergusson *et al.*, 1996). Actualmente, no existen terapias para prevenir efectivamente o mejorar la cicatrización.

Se ha observado la función del TGFbeta en la fibrosis pulmonar (Wynn *et al.*, J. Pathology 2008, 214, p. 199-210; Sime *et al.*, J. Clinical Immunology 1997, Vol. 100, p. 768-776). Un cambio hacia la producción incrementada de citocinas Th2 y la producción disminuida de citocinas Th1, se observa como resultado de una lesión pulmonar desconocida. La sobreexpresión del TGFbeta estimula la angiogénesis, la activación de los fibroblastos, la deposición de la ECM y la fibrogénesis. Modelos animales (por ejemplo, sobreexpresión del TGFbeta, expresión bloqueada de SMAD3, inhibición de la señalización del TGFbetaR), muestran que el TGFbeta es un mediador clave para el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

La “fibrosis pulmonar idiopática (IPF)”, es una enfermedad progresiva y crónica que resulta en la deposición anormal y excesiva de tejido fibrótico en el intersticio pulmonar sin una causa conocida. Existe una incidencia de aproximadamente 10 a 20 casos por 100,000 en los Estados

Unidos por año. La frecuencia se incrementa agudamente con la edad, alcanzando 175 casos por 100,000 sobre la edad de 75 años con inicio que ocurre usualmente entre los 50 y 70 años. La tasa de supervivencia de 5 años es de 20% con una supervivencia media de 2.8 años. Los síntomas incluyen una tos seca y falta de aliento progresiva, rayos X anormales del tórax o HRCT y volúmenes pulmonares reducidos. Los tratamientos actuales incluyen corticosteroides (prednisona), inmunosupresores (ciclofosfamida) o trasplante, aunque ninguna de las terapias actualmente disponibles tiene una eficacia demostrada. En una modalidad, el dominio variable individual o polipéptido de la presente descripción provee un tratamiento para la IPF.

Convenientemente, un tratamiento exitoso para la fibrosis pulmonar idiopática (IPF) mostrará cualquiera de una disminución en la proliferación de fibroblastos del pulmón, un incremento en la apoptosis de fibroblastos del pulmón, una disminución en la síntesis y deposición excesivas de la matriz extracelular o un incremento en la degradación y reconstrucción de la matriz extracelular, o mostrará cierta protección contra la lesión del tejido en curso y la restauración de la histopatología normal.

Convenientemente, un tratamiento exitoso desaceleraría la progresión de la enfermedad.

La eficacia de un tratamiento para la IPF puede demostrarse en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. En una modalidad, el dominio variable individual de inmunoglobulina de la presente descripción reacciona en forma cruzada con el TGFbetaRII de ratón, de modo que su

eficacia puede ponerse a prueba en el modelo de ratón.

El TGFbeta es una importante molécula de señalización celular en la modulación del comportamiento celular en tejidos oculares. La activación excesiva del TGFbeta está implicada en la patogénesis de enfermedades
5 fibróticas en el tejido ocular, la cual puede estar relacionada con la curación de la herida y llevar a visión deteriorada y homeostasis del tejido ocular (revisado, por ejemplo, por Saika, Laboratory Investigation (2006), 86, 106-115).

Por consiguiente, en una modalidad, las enfermedades
10 asociadas con la señalización del TGFbeta incluyen trastornos oculares tales como enfermedades fibróticas del tejido ocular. La enfermedad fibrótica del ojo puede ocurrir en la córnea, conjuntiva, cristalino o retina. Los trastornos oculares incluyen vitreo-retinopatía proliferativa (PVR), un trastorno de post-desprendimiento retinal y fibrosis retinal, retinopatía diabética, glaucoma tal
15 como glaucoma de ángulo abierto, glaucoma de cierre de ángulo, síndrome congénito y de pseudo-exfoliación, reacciones de curación de la herida en el cristalino, tal como quemadura post-química o térmica, síndrome de Stevens-Johnson, y complicaciones post-cirugía de cataratas. El TGFbeta tiene también una función en el desarrollo de cataratas (Wormstone *et al.* Exp Eye
20 Res; 83 1238-1245, 2006). Muchos trastornos oculares ocurren como resultado de fibrosis post-cirugía. Además, se cree que la actividad excesiva del TGFbeta2 (factor de crecimiento transformante β 2) causa cicatrización en y alrededor del ojo después de la cirugía de filtración del glaucoma. El

TGFbeta2 es la isoforma predominante implicada en la cicatrización patológica de los tejidos oculares que incluyen la córnea, la retina, la conjuntiva y la red trabecular. La cicatrización o fibrosis de la red trabecular puede llevar a la oclusión de la vía de eflujo acuoso normal que lleva a presión

5 intraocular elevada y riesgo de desarrollo de glaucoma. Se ha mostrado que el TGFbeta 2 es un agente patológico en modelos preclínicos de glaucoma. Los niveles del TGFbeta2 están elevados en los pacientes con glaucoma, y el tratamiento *in vitro* de células huTM con el TGFbeta-2, lleva a cambios fenotípicos y sobreexpresión de las proteínas que modulan la ECM (MMP-2,

10 PAI-I) (Lutjen-Drecol (2005), Experimental Eye Research, Vol. 81, emisión 1, págs. 1-4; Liton (2005), Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 337, emisión 4, p. 1229-1236; Fuchshofer *et al* (2003), Experimental Eye Research, Vol. 77, emisión 6, p. 757-765; Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) cartel de conferencia #1631

15 2009). Además, la sobreexpresión del TGFbeta en el ojo, lleva a una patología tipo glaucoma en ratones (ARVO, cartel de conferencia #5108 2009), y se ha mostrado que el suministro del TGFbeta-2 usando AAV, inhibe la pérdida de células ganglionares retinales en un modelo de glaucoma de rata (ARVO, cartel de conferencia #5510 2009). Más recientemente, se ha mostrado que la

20 inducción de estrés oxidativo en los astrocitos cultivados de la cabeza del nervio óptico humano, incrementa la secreción del TGFbeta2 (Yu *et al* (2009) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: 1707-1717). Todo esto indica que la reducción de los niveles del TGFbeta 2 podría reducir al mínimo los cambios

característicos de la cabeza del nervio óptico observados en el glaucoma. Sin embargo, se sabe también que el TGFbeta tiene una función inmunosupresora, y de esta manera en algunos aspectos puede ser protector, de modo que una reducción en los niveles elevados del TGFbeta2 más que un
5 derribo completo, puede preferirse en el tratamiento de condiciones oculares crónicas tales como el glaucoma. Por consiguiente, enfermedades que pueden tratarse usando los dAbs y composiciones, etc. de conformidad con la descripción, incluyen la cicatrización post-cirugía de filtración del glaucoma.

Por consiguiente, en un aspecto, se provee un método para el
10 tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad asociada con la señalización del TGFbeta y, en particular, la señalización disregulada del TGFbeta, que comprende administrar a un mamífero que necesita del mismo, una dosis o cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido, proteína de fusión, dominio variable individual, antagonista o composición de conformidad
15 con la descripción.

En otro aspecto, la descripción provee un dominio variable individual de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión de conformidad con la descripción, para su uso como un medicamento. Un medicamento adecuado puede comprender un dominio variable individual de
20 inmunoglobulina, etc. de conformidad con la descripción, formateado como se describe en la presente.

Convenientemente, el medicamento es una composición farmacéutica. En otro aspecto de la descripción, se provee una composición

(por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende un polipéptido, dominio variable individual, ligando, composición o antagonista de conformidad con la descripción, y un vehículo, diluyente o excipiente fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la

5 composición comprende un vehículo para suministro. En modalidades particulares, el polipéptido, proteína de fusión, dominio variable individual, antagonista o composición se administra por medio de suministro pulmonar, tal como por inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, inhalación intranasal tal como por gotas), o mediante suministro

10 sistémico (por ejemplo, administración parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intraarticular, subcutánea, vaginal o rectal). En otra modalidad, el polipéptido, dominio variable individual, ligando o proteína de fusión o composición de conformidad con la descripción, se administra al ojo, por ejemplo, mediante administración tópica, como colirios,

15 sistema de polímero de materia en partículas, gel o implante, o mediante inyección intraocular, por ejemplo, en el humor vítreo. El suministro puede ser dirigido hacia regiones particulares del ojo tales como la superficie del ojo, o los conductos lagrimales o glándulas lagrimales, o hacia las cámaras anterior o posterior del ojo tal como el humor vítreo). Puede ser también útil si el

20 dominio variable individual de inmunoglobulina, composición etc. se suministra hacia el ojo junto con un intensificador de penetración ocular, por ejemplo, caprato de sodio o con un intensificador de viscosidad, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En otras modalidades, el polipéptido,

proteína de fusión, dominio variable individual, antagonista o composición se administra a la piel, mediante el suministro tópico hacia la superficie de la piel y/o el suministro hacia una región dentro de la piel, por ejemplo, suministro intradérmico.

5 Aunque el órgano más accesible del cuerpo para suministro, la barrera más exterior de la piel, el estrato córneo (SC), actúa como una barrera limitativa de velocidad para el suministro de fármacos, tradicionalmente, se ha requerido la inyección intradérmica para evitar el SC, permitiendo el suministro del fármaco hacia un sitio de acción en capas más profundas de la piel. Sin
10 embargo, el suministro puede lograrse a través de otros procedimientos de suministro transdérmicos. Pueden usarse metodologías de formulación para el suministro, que incluyen: intensificadores químicos que alteran la estructura de lípidos del SC; facilitadores de péptidos que permiten el transporte transfolicular; y la encapsidación en partículas que incluyen liposomas,
15 niosomas, etosomas y transferosomas, que se cree facilitan la fluidización local de los lípidos y la formación de depósitos para efecto prolongado. La iontoforesis, que implica la aplicación de un pequeño potencial eléctrico a través de la piel, se ha usado para el suministro localizado de fármacos. La iontoforesis permite el suministro de moléculas con carga y neutras mediante
20 electromigración y electroósmosis, respectivamente. Pueden usarse microagujas para crear canales de tamaño en micras en la piel para superar el SC, permitiendo que las proteínas pasen a través de estos canales hacia la epidermis inferior. Las microagujas pueden clasificarse ampliamente en

microagujas sólidas y huecas. Las microagujas sólidas pueden usarse para disolver el SC, antes de la administración del fármaco, recubiertas para permitir el suministro conforme el fármaco se disuelve de las agujas, o solubles permitiendo la liberación del fármaco conforme las agujas se disuelven *in situ*. Las microagujas huecas permiten la infusión de una formulación líquida de sustancia de fármaco. La electroporación, a diferencia de la iontoforesis, requiere voltajes mayores de 50V para alterar la permeabilidad de la piel, para mejorar la penetración del fármaco. Las metodologías de ablación térmica y con radiofrecuencia permiten la disolución del SC a través del calentamiento y ablación localizados del SC. En la ablación térmica, esto resulta después de la aplicación de una alta temperatura por períodos cortos, mientras que la ablación por radiofrecuencia implica el uso de radiofrecuencias, que hacen vibrar los microelectrodos sobre la piel, resultando en calentamiento localizado. La disolución del SC puede lograrse también a través de la abrasión láserica, la aplicación de ondas de ultrasonido de baja frecuencia (sonoforesis) e inyectores de chorro usando altas velocidades que impulsan el fármaco a través del SC.

Además, la presente descripción provee un método para el tratamiento de enfermedades usando un polipéptido, dominio variable individual, composición, ligando o antagonista de conformidad con la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad es una fibrosis de tejido tal como enfermedad queloide o contractura de Dupuytren.

En un aspecto de la descripción, el polipéptido, dominio variable

individual, ligando, composición o antagonista, se provee para la terapia y/o la profilaxis de una enfermedad o condición asociada con la señalización del TGFbeta en un humano. En otro aspecto, se provee el uso del polipéptido, dominio variable individual, composición o antagonista, en la fabricación de un medicamento para la terapia o profilaxis de una enfermedad o condición asociada con la señalización del TGFbeta en un humano. En otro aspecto, se provee un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición asociada con la señalización del TGFbeta en un paciente humano, el método comprendiendo administrar el polipéptido, dominio variable individual, composición o antagonista, al paciente. La descripción se refiere también a métodos terapéuticos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un ligando de la descripción (por ejemplo, antagonista o dominio variable individual) a un sujeto que necesita del mismo.

En otras modalidades, la descripción se refiere a un método para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, que comprende administrar a un sujeto que necesita del mismo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un ligando de la descripción (por ejemplo, antagonista o dominio variable individual).

La descripción se refiere también a un dispositivo de suministro de fármacos que comprende la composición (por ejemplo, composición farmacéutica) de la descripción. En algunas modalidades, el dispositivo de suministro de fármacos comprende una pluralidad de dosis terapéuticamente efectivas de ligando.

En otras modalidades, el dispositivo de suministro de fármacos se selecciona del grupo que consiste de dispositivo de suministro parenteral, dispositivo de suministro intravenoso, dispositivo de suministro intramuscular, dispositivo de suministro intraperitoneal, dispositivo de suministro transdérmico o intradérmico, dispositivo de suministro pulmonar, dispositivo de suministro intraarterial, dispositivo de suministro intratecal, dispositivo de suministro intraarticular, dispositivo de suministro subcutáneo, dispositivo de suministro intranasal, dispositivo de suministro ocular, dispositivo de suministro vaginal, dispositivo de suministro rectal, jeringa, un dispositivo de suministro transdérmico, un dispositivo de suministro intradérmico, una cápsula, una tableta, un nebulizador, un inhalador, un atomizador, un dispositivo de aerosol, un vaporizador, un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida, un rociador de dosis medida, un vaporizador de dosis medida, un atomizador de dosis medida y un catéter. En una modalidad, el dispositivo de suministro de fármacos es un dispositivo de suministro transdérmico o intradérmico.

Convenientemente, la descripción provee un dispositivo de suministro pulmonar que contiene un polipéptido, dominio variable individual, composición o antagonista de conformidad con la descripción. El dispositivo puede ser un inhalador o un dispositivo de administración intranasal. Convenientemente, el dispositivo de suministro pulmonar permite el suministro de una dosis terapéuticamente efectiva de un ligando, etc. de conformidad con la descripción.

En otra modalidad, la descripción provee un dispositivo de suministro ocular que contiene un polipéptido, dominio variable individual, composición o antagonista de conformidad con la descripción. Convenientemente, el dispositivo de suministro ocular permite el suministro de una dosis terapéuticamente efectiva de un ligando, etc. de conformidad con la descripción.

Como se usa en la presente, el término “dosis” se refiere a una cantidad de ligando administrada a un sujeto toda a la vez (dosis unitaria), o en dos o más administraciones durante un intervalo de tiempo definido. Por ejemplo, la dosis puede referirse a la cantidad de ligando (por ejemplo, ligando que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina que se une al TGFbetaRII) administrado a un sujeto durante el curso de un día (24 horas) (dosis diaria), dos días, una semana, dos semanas, tres semanas, o uno o más meses (por ejemplo, mediante una sola administración, o mediante dos o más administraciones). El intervalo entre las dosis puede ser cualquier cantidad deseada de tiempo. En una modalidad particular, el dominio variable individual o polipéptido de la invención se administra en la piel mediante inyección, en particular mediante suministro intradérmico, semanalmente o quincenalmente o cada 7 a 10 días, por ejemplo, cada 7, 8, 9 o 10 días.

En una modalidad, el dominio variable individual de la descripción se provee como un monómero de dAb, opcionalmente no formateado (por ejemplo, no PEGilado o de vida media extendida) o enlazado a un PEG, opcionalmente como una formulación de polvo seco,

opcionalmente para suministro a un paciente por inhalación (por ejemplo, suministro pulmonar), opcionalmente para el tratamiento y/o la prevención de una condición pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática).

Los ligandos de la descripción proveen varias ventajas. Por ejemplo, como se describe en la presente, el ligando puede ser adaptado para que tenga una vida media en suero *in vivo* deseada. Los anticuerpos de dominio son mucho más pequeños que los anticuerpos convencionales, y pueden administrarse para lograr mejor penetración en los tejidos que los anticuerpos convencionales. De esta manera, los dAbs y los ligandos que comprenden un dAb proveen ventajas sobre los anticuerpos convencionales cuando se administran para tratar una enfermedad, tal como una enfermedad mediada por la señalización del TGFbeta. En particular, el suministro pulmonar de un dAb de la presente descripción para tratar la fibrosis pulmonar idiopática, permite el suministro local específico de un inhibidor de la señalización del TGFbeta. En forma ventajosa, un monómero de dAb no formateado que se une específicamente al TGFbetaRII e inhibe al mismo, es bastante pequeño para ser absorbido en el pulmón a través del suministro pulmonar.

Los ejemplos del documento WO2007085815 se incorporan en la presente como referencia para proveer detalles de pruebas relevantes, formateo y experimentos que pueden aplicarse igualmente a los ligandos de la presente descripción.

Todas las publicaciones que incluyen, pero no están limitadas a,

patentes y solicitudes de patente, citadas en esta especificación, se incorporan en su totalidad en la presente como referencia.

La descripción se describe además, sólo para los propósitos de ilustración, en los siguientes ejemplos.

5

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Selección de dAbs que se unen al TGFbetaRII

10

Selección de dAbs que se unen al TGFbetaRII de ratón

Selecciones sin afectación: Se usaron colecciones de fagos 4G y 6G sin afectación, colecciones de fagos que exhiben dominios variables individuales de anticuerpo expresados a partir de la secuencia guía GAS1 (véase el documento WO2005093074) para 4G, y adicionalmente con preselección con calor/frío para 6G (véase el documento WO04101790). Las secuencias guía DOM23 se aislaron por toma panorámica de grupos de colecciones de VH y VK (identificadas como 4G H11-19 y 6G VH2-4 (dAbs de VH) y 4G κ 1, 4G κ 2 y 6G κ (dAbs de Vk) contra la proteína quimérica recombinante TGF- β RII/Fc de humano y de ratón. Estas proteínas quiméricas se obtuvieron mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica para los residuos de aminoácido 24 a 159 del dominio extracelular del receptor del TGF- β tipo II de humano (Lin, *et al.*, 1992, *Cell* 68: 775-785)

15

20

fusionado con la región Fc de la IgG1 humana en una línea de células de riñón embrionario humano, HEK-F.

Las proteínas quiméricas recombinantes TGF- β RII/Fc de humano y de ratón, fueron biotiniladas usando el reactivo EZ-LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce, Rockford, USA) (Henderikx, *et al.*, 2002, Selection of
5 antibodies against biotinylated antigens. Antibody Phage Display: Methods and protocols, Ed. O'Brien y Atkin, Humana Press). Las colecciones de fagos se agruparon en seis grupos: 4G κ 1 y κ 2, 6G κ , 4G H11-13, 4G H14-16, 4G H17-19 y 6G VH2-4. Se agruparon 1×10^{11} fagos por colección.

10 Los fagos fueron bloqueados en leche en polvo MARVEL™ a 2% en solución salina regulada en su pH con fosfato (MPBS) con la adición del fragmento Fc de IgG humana 10 μ M (fragmento Fc de IgG nativa derivado de IgG de plasma de mieloma humano, Calbiochem, California, US, No. de catálogo 401104) por una hora. Se incubó el TGF- β RII/Fc 200 nM biotinilado
15 de ratón con la mezcla del fragmento Fc y el fago bloqueado por 1 hora a temperatura ambiente, y entonces se capturó sobre DYNAbeads™ de estreptavidina (Dynal, Reino Unido) por cinco minutos. Las perlas se lavaron siete veces con 1 ml de solución salina regulada en su pH con fosfato/TWEEN™ a 0.1% (PBST), seguido de un lavado con 1 ml de solución
20 salina regulada en su pH con fosfato (PBS). El fago unido al TGF- β RII/Fc biotinilado de ratón fue eluido en 500 μ l de 1 mg/ml de tripsina en PBS por 10 minutos, y se usó entonces para infectar a 1.75 ml de TG1 de *Escherichia coli* de fase logarítmica por 30 minutos. Las células se sembraron en placas de

agar 2 x TYE (extracto de levadura y triptona) complementado con 15 µg/ml de tetraciclina. Para las rondas de selecciones subsiguientes, las células se rasparon de las placas y se usaron para inocular 50 ml de cultivos 2 x TY (levadura y triptona) + 15 µg/ml de tetraciclina, que se desarrollaron durante la
5 noche a 37 °C para la amplificación del fago.

El fago amplificado se recuperó mediante centrifugación del cultivo la noche anterior por 10 minutos a 4566 g. Se añadieron 40 ml de sobrenadante que contenía al fago amplificado a 10 ml de PEG/NaCl (PEG 8000 a 20% en v/p + NaCl 2.5 M), y se incubaron sobre hielo por 45 a 60
10 minutos. Las muestras se centrifugaron por 30 minutos a 4566 g para convertir a pellas el fago precipitado. El sobrenadante se desechó, y la pella del fago se resuspendió en 2 ml de glicerol a 15% en v/v/PBS. La muestra del fago se transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml, y se centrifugó por 10 minutos para remover cualquier resto de células bacterianas restantes. El fago se usó
15 como fago de entrada para la segunda ronda de selección. La segunda ronda de selección se llevó a cabo como se describió para la primera ronda, salvo que se añadieron aproximadamente 1×10^{10} fagos, y se usó TGF-β RII/Fc 200 nM de humano o TGF-β RII/Fc 20 nM de ratón en las selecciones.

Los productos de la segunda ronda fueron clonados a partir del
20 vector de fago fd, pDOM4 en pDOM10. El vector pDOM4, es un derivado del vector de fago fd en el cual la secuencia del péptido de señal del *gen III* es reemplazada con el péptido de señal de la proteína de superficie anclada a glucolípidos (GAS) de levadura. Contiene también un marcador *c-myc* entre la

secuencia guía y el *gen III*, el cual pone el *gen III* de nuevo en el marco de lectura. Esta secuencia guía funciona bien en los vectores de exhibición de fagos, pero también en otros vectores de expresión procarióticos, y puede usarse universalmente. pDOM10 es un vector de plásmido diseñado para la
5 expresión soluble de los dAbs. Se basa en el vector pUC119, con expresión bajo el control del promotor *LacZ*. La expresión de los dAbs en el sobrenadante se garantizó mediante la fusión del gen del dAb con el péptido de señal guía de GAS universal (véase el documento WO2005093074) en el extremo N-terminal. Además, se anexó un marcador FLAG en el extremo C-
10 terminal de los dAbs.

La subclonación de los genes de los dAbs se llevó a cabo aislando el ADN de pDOM4 de las células infectadas por el fago fd que exhibe al dAb seleccionado usando un kit QIAPREP™ Spin MINIPREP™, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (No. de catálogo 27104, Qiagen). El ADN
15 se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos biotinilados DOM57 (5' TTGCAGGCGTGGCAACAGCG-3' (SEQ ID NO: 197) y DOM6 (5'-CACGACGTTGTAAAACGACGGCC-3' (SEQ ID NO: 198)), digerido con las endonucleasas de restricción Sall y NotI, y ligado con pDOM10 digerido con Sall y NotI. Los productos de ligación fueron transformados por
20 electroporación en células HB2151 de *E. coli* y sembrados en placas de TYE (extracto de levadura y triptona) complementado con 100 µg/ml de carbenicilina (TYE-carb). Los clones individuales fueron seleccionados y expresados en medio de autoinducción rápida la noche anterior (sistema de

expresión de proteínas de alto nivel, Novagen) complementado con 100 µg/ml de carbenicilina en placas de 96 cavidades, cultivadas con agitación a 30°C o 37°C. Estas placas de expresión se centrifugaron entonces a 1800 g por 10 minutos. Los clones del dAb que se unieron al TGF-β RII/Fc de ratón y/o humano se identificaron mediante una ELISA y tamizado BIACORE™ (GE HEALTHCARE™) o mediante tamizado por prueba de unión MSD (Meso Scale Discovery). Para la ELISA, inmunoplasacas Maxisorp™ de 96 cavidades (Nunc, Dinamarca) fueron recubiertas con el TGF-β RII/Fc de humano o de ratón durante la noche a 4°C. Las cavidades se lavaron tres veces con PBST, y fueron bloqueadas entonces con TWEEN™ a 1% en PBS (TPBS a 1%) por 1 hora a temperatura ambiente. El bloqueo se removió y se añadió una mezcla 1:1 de TPBS a 1% y el sobrenadante del dAb se añadió por 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con PBST, y el anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal de peroxidasa M2 anti-FLAG, Sigma-Aldrich, Reino Unido) se añadió y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se desarrollaron usando un substrato colorimétrico (solución de peroxidasa de microcavidades de TMB de 1 componente SUREBLUE™, KPL, Maryland, USA), y se midió la densidad óptica (DO) a 450 nM, la DO₄₅₀ siendo proporcional a la cantidad de anticuerpo de detección unido. Para BIACORE™, los sobrenadantes se diluyeron 1:1 en regulador de pH de HBS-EP y se tamizaron sobre BIACORE™ para unión al TGF-β RII/Fc biotinilado de humano y de ratón (chip de SA recubierto con 1500 Ru de hRII-Fc biotinilado y 1550 Ru de mRII-Fc biotinilado, de acuerdo con las

recomendaciones del fabricante) (BIACORE™, GE HEALTHCARE™). Se hicieron correr las muestras sobre BIACORE™ a una magnitud de flujo de 50 µl/min.

5 Selecciones sin afectación de humano y tamizado de las mismas

Selección de dAbs que se unen al TGFbetaRII de humano

 Se hicieron selecciones sin afectación como se describió para el TGFbRII de ratón, pero usando TGFbRII/Fc 150 y 15 nM biotinilado de humano en la ronda uno y dos, respectivamente. Se llevó a cabo una tercera
10 ronda usando el mismo método como para la ronda dos, pero con TGFbRII/Fc 1.5 nM biotinilado de humano.

 Los productos de la tercera ronda fueron clonados a partir del vector de fago fd, pDOM4 en pDOM10. La subclonación de los genes del dAb
15 se llevó a cabo aislando el ADN de pDOM4 de las células infectadas por el fago fd seleccionado que exhibe al dAb usando un kit QIAPREP™ Spin MINIPREP™, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (No. de catálogo 27104, Qiagen). El ADN del plásmido fue digerido con las endonucleasas de restricción Sall y NotI, y la inserción del gen del dAb ligada con pDOM10
20 digerido con las endonucleasas de restricción Sall, NotI y PstI. Los productos de ligación fueron transformados mediante electroporación en células HB2151 de *E. coli* y sembrados en placas de TYE (extracto de levadura y triptona) complementados con 100 µg/ml de carbenicilina (TYE-carb). Los clones

individuales fueron seleccionados y expresados en placas de 96 cavidades a 250 rpm, 30°C por 72 horas, en 1 ml/cavidad de medio de autoinducción rápida la noche anterior (Novagen) complementado con 100 µg/ml de carbenicilina. Estas placas se centrifugaron entonces a 1800 g por 10 minutos.

- 5 Los sobrenadantes solubles del dAb fueron tamizados para la unión al antígeno en la prueba de unión al TGFβRII MSD combinada con la prueba de determinación de la concentración de polarización por fluorescencia. El número de enlazadores del TGFβRII de humano fue alto, y hubo muchos clones para su uso para más caracterización. Por lo tanto, un subgrupo de clones fue secuenciado, y aquellos con secuencias únicas fueron
- 10 caracterizados adicionalmente.

Prueba de unión al TGFβRII MSD

- Esta prueba se usó para determinar la actividad de unión de los
- 15 dAbs anti-TGFβRII. El antígeno del TGFβRII-Fc fue recubierto sobre una placa de MSD, la cual fue bloqueada posteriormente para prevenir la unión no específica. Se añadieron los sobrenadantes diluidos en serie que contenían al dAb soluble marcado con FLAG. Después de la incubación, la placa se lavó, y sólo los dAbs que se unieron específicamente al TGFβRII-Fc permanecieron
- 20 unidos a la placa. Los dAbs unidos se detectaron con un anticuerpo anti-FLAG rutenilado marcado y regulador de pH de lectura de MSD. Si se determinaba la concentración de los dAbs en las diluciones del sobrenadante usando la prueba de determinación de la concentración de polarización por

fluorescencia, entonces las curvas de unión de la concentración se graficaban.

0.5 µl por cavidad de 60 µg/ml del TGFbRII-Fc de humano, 60 µg/ml del TGFbRII-Fc de ratón o 60 µg/ml de Fc de IgG1 humana (R&D Systems, número de catálogo 110-HG), se aplicaron sobre placas de alta
5 unión MSD (Meso Scale Discovery) de 384 cavidades. Las placas se secaron al aire a temperatura ambiente por un mínimo de cuatro horas y no por más tiempo que durante la noche. Las placas fueron bloqueadas con 50 µl por cavidad de MARVEL™ a 5% en solución salina regulada en su pH con Tris (TBS) + TWEEN™ 20 a 0.1% por 1 hora a temperatura ambiente o durante la
10 noche a 4°C. El reactivo de bloqueo se removió de las cavidades sacudiendo las placas. Una serie de diluciones 1:3 de los sobrenadantes del dAb se preparó en medio 2xTY. Los dAbs fueron expresados en el vector de expresión pDOM10, de modo que la proteína del dAb fuese expresada como una proteína de fusión de FLAG. El reactivo de bloqueo se removió, y se
15 transfirieron 10 µl por cavidad de los sobrenadantes del dAb diluidos a las placas MSD bloqueadas. Los sobrenadantes de los dAbs fueron tamizados como curvas de 4 puntos o como curvas de 11 puntos. Además de los sobrenadantes del dAb diluidos, se incluyeron dos controles en cada placa, uno de bajo control (normalizado a unión de 0%) sin especificidad de unión al
20 TGFbRII, y uno de alto control (normalizado a unión de 100%) con alta especificidad de unión al TGFbRII, datos no mostrados.

Las placas se incubaron con los sobrenadantes del dAb y las muestras control por una hora a temperatura ambiente, y entonces se lavaron

tres veces con 50 µl por cavidad de TBS + TWEEN™ a 0.1%. Se añadieron 15 µl/cavidad de anticuerpo anti-FLAG rutenilado a las placas, y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-FLAG (anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG, Sigma, Reino Unido, número de catálogo F3165),
5 fue conjugado con tris-bipiridin N-hidroxi succinimida de rutenio II, siguiendo las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, número de catálogo R91BN-1). El anticuerpo anti-FLAG rutenilado se añadió a todas las cavidades, salvo a las cavidades control del anticuerpo de Fc de IgG1 anti-humano de ratón, y más bien se añadieron 15 µl/cavidad de marcador MSD
10 anti-ratón (Meso Scale Discovery, número de catálogo R31AC-1). El marcador MSD anti-ratón fue diluido en MARVEL™ a 2% en TBS + TWEEN™ 20 a 0.1% hasta una concentración final de 750 ng/ml. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por una hora y se lavaron tres veces con 50 µl por cavidad de TBS + TWEEN™ a 0.1%. Se añadieron 35 µl de 1x regulador de
15 pH de lectura MSD (Meso Scale Discovery) a cada cavidad, y las placas se leyeron en un lector MSD Sector 6000 (Meso Scale Discovery).

Los datos se analizaron usando la base de actividad XC50. Todos los datos fueron normalizados a la media de las placas de alto y bajo control en cada placa, con la de bajo control normalizada para unión de 0%. y
20 la de alto control normalizada para unión de 100%. Se aplicó un ajuste de la curva de cuatro parámetros a los datos normalizados, y se graficaron las curvas de unión de la concentración usando las concentraciones del dAb calculadas usando la determinación de la concentración de polarización por

fluorescencia de los dAbs en la prueba de los sobrenadantes.

El ajuste de cuatro parámetros usado, fue el siguiente:

$$y = \frac{(a - d)}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d$$

- 5 en donde a es el mínimo, b es la pendiente de Hill, c es la XC50, y d es el máximo.

Determinación de la concentración de polarización por fluorescencia de los dAbs en la prueba de los sobrenadantes

- 10 Esta prueba permite que se determine la concentración de los dAbs solubles marcados con FLAG expresados en los sobrenadantes. Un péptido de FLAG marcado con fluorescencia se mezcló con un anticuerpo anti-FLAG. Las moléculas fluorescentes fueron excitadas con luz polarizada a una longitud de onda de 531 nM, y la luz polarizada emitida se leyó a una
- 15 longitud de onda de 595 nM. La adición de un dAb marcado con FLAG resultó en el desplazamiento del péptido fluorescente del anticuerpo anti-FLAG, lo cual resultó a su vez en polarización reducida de la señal de emisión. Una curva estándar de concentraciones conocidas del dAb sustituto de VH purificado marcado con FLAG, se preparó y se usó para volver a calcular la
- 20 concentración de los dAbs solubles en los sobrenadantes. Los datos de la concentración se combinaron con los datos de la actividad de unión, permitiendo que las curvas de unión de la concentración fuesen graficadas para los sobrenadantes del dAb.

Los sobrenadantes del dAb fueron diluidos en serie 1:2 en medio 2xTY (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16), seguido de una dilución 1:10 en solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS). Los sobrenadantes diluidos se transfirieron a una placa negra de 384 cavidades. Se trazó una curva estándar diluyendo en serie el dAb sustituto de VH purificado 1:1.7 en medio 2xTY a 10% en v/v en PBS. La concentración más alta del dAb fue de 10 μ M, y hubo 16 diluciones en total. 5 μ l de cada dilución se transfirieron a la placa de 384 cavidades. Se preparó una mezcla de péptido de FLAG 5 nM marcado en el extremo C-terminal con Cy3b, anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG 100 mM (Sigma, número de catálogo F3165), 0.4 mg/ml de albúmina de suero de bovino (BSA) en regulador de pH de CHAPs 2 mM. 5 μ l de la mezcla se transfirieron a las cavidades que contenían a los dAbs diluidos (sobrenadantes y las cavidades de la curva estándar). La placa se centrifugó a 1000 rpm (216 g) por 1 minuto, y se incubó entonces en la oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos. Las placas se leyeron en un lector ENVISION™ (Perkin Elmer) ajustado con los siguientes filtros:

Filtro de excitación: BODIPY TMR FP 531

Filtro de emisión: BODIPY TMR FP P pol 595

Filtro de emisión 2: BODIPY TMR FP P pol 595

Espejo: BODIPY TMR FP Dual Enh.

La curva estándar se graficó y se usó para volver a calcular las concentraciones de los dAbs solubles en los sobrenadantes.

Los dAbs que se unen al TGF- β RII/Fc de ratón y de humano

identificados en las pruebas de unión ELISA, BIACORE™ y MSD, fueron expresados en medio de autoinducción rápida la noche anterior (ONEX™, Novagen) a 30 °C por 48 a 72 horas. Los cultivos se centrifugaron (4,600 rpm por 30 minutos), y los sobrenadantes se incubaron con perlas de

5 STREAMLINE™-proteína A (Amersham Biosciences, GE HEALTHCARE™, Reino Unido. Capacidad de unión: 5 mg del dAb por ml de perlas), durante la noche a 4 °C o a temperatura ambiente por cuando menos una hora. Las perlas se empacaron en una columna de cromatografía y se lavaron con 1x o 2x PBS, seguido de Tris-HCl 10 o 100 mM, pH 7.4 (Sigma, Reino Unido). Los

10 dAbs unidos fueron eluidos con glicina-HCl 0.1 M, pH 2.0, y neutralizados con Tris 1 M, pH 8.0. Se midió la DO de los dAbs a 280 nm, y se determinaron las concentraciones de proteína usando los coeficientes de extinción calculados a partir de las composiciones de aminoácidos de los dAbs.

Se dan a continuación las secuencias de aminoácidos y de ácido

15 nucleico de las secuencias guía sin afectación del dAb del TGFRII anti-humano y anti-murino.

Secuencia de aminoácidos de Dom23h 802 (SEQ ID NO: 1)

EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAAS G FTFSEGT M W WVRQAPGK GLEWVS

20 AIL AAGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAK KRQ

ERDGF DYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de Dom23h 802 (SEQ ID NO: 39)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGTGAGGGGAC
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
5 AGCTATTTTGGCTGCTGGTTCTAATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAA
AGAGGCAGGAGCGGGATGGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGG
TCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de Dom23h 803 (SEQ ID NO: 2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAGRMWWVRQAPGKGLEWVS
AINRDGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHDD
GHGNFDYWGQGTLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de Dom23h 803 (SEQ ID NO: 40)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGTGCTGGGCG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
20 AGCGATTAATCGGGATGGTACTAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA

CATGATGATGGTCATGGTAATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-813 (SEQ ID NO: 3)

5 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTDDRMWWVRQAPGKGLEWVS
AIQPDGHTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEQDV
KGSSSF DYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-813 (SEQ ID NO: 41)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGATGATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
AGCTATTCAGCCTGATGGTCATACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
15 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGAAC
AGGATGTTAAGGGGTCGTCTTCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-815 (SEQ ID NO: 4)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAEDRMWWVRQAPGKGLEWVS
AIDPQGQHTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQST
GSATSDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-815 (SEQ ID NO: 42)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGGAGGATC
GGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
5 CAGCTATTGATCCTCAGGGTCAGCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
CAGTCTACTGGGTCTGCTACGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGG
TCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-828 (SEQ ID NO: 5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMSYRMWWVRQAPGKGLEWVS
AISP SGSDTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQVV
EYSRTHKGVFDYWQQGTLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-828 (SEQ ID NO: 43)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTATGAGTTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
20 AGCTATTTCTCCGAGTGGTAGTGATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC

AGGTGGTGGAGTATTCGCGTACTCATAAGGGTGTGTTTGACTACTGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-830 (SEQ ID NO: 6)

5 EVQLLES GGGLVQPGGFLRLSCAASGFTFEGYRMWWVRQAPGKGLEWVS
AIDSLGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGL
THQSPSTFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-830 (SEQ ID NO: 44)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TTCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAGGGGTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
AGCTATTGATTCTCTGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
15 ATGAACAGTCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
AGGGGCTTACGCATCAGTCTCCGAGTACTTTTGACTACTGGGGTCAGGG
AACCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-831 (SEQ ID NO: 7)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYKMTWVRQAPGKGLEWVSYI
TPSGGQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYGSS
FDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-831 (SEQ ID NO: 45)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAGGCGTATAA
GATGACGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTC
5 ATATATTACGCCGTCTGGTGGTCAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAT
ATGGTTCGAGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC
GAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-840 (SEQ ID NO: 8)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGDGRMWWVRQAPGKGLEWVS
AIEGAGSDTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAS
RNSPFDYWGGQGLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-840 (SEQ ID NO: 46)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGGATGGTC
GTATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
20 AGCTATTGAGGGGGCGGGTTCGGATACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA

CAGGCGTCGCGGAATTCGCCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGGACCCTGG
TCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-842 (SEQ ID NO: 9)

5 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDSEMAWARQAPGKGLEWVSLI
RRNGNATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVTKD
RSVLFDYWGGGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-842 (SEQ ID NO: 47)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATGATAGTGA
GATGGCGTGGGCCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACTTATTCGGCGTAATGGTAATGCTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
15 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAG
TTACGAAGGATCGTTCTGTGCTTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-843 (SEQ ID NO: 10)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDQDRMWWVRQAPGKGLEWVS
AIESGGHRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQNE
SGRSGFDYWGGGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-842 (SEQ ID NO: 48)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATCAGGATCG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
5 AGCTATTGAGAGTGGTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
CAGAATGAGTCGGGGCGTTCGGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-850 (SEQ ID NO: 11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDAARMWWARQAPGKGLEWVS
AIADIGNTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQSGS
EDHFDYWGGGTLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-850 (SEQ ID NO: 49)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATGCGGCTAG
GATGTGGTGGGCCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
20 AGCGATTGCGGATATTGGTAATACTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC

AGTCTGGTTCGGAGGATCATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-854 (SEQ ID NO: 12)

5 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAQDRMWWVRQAPGKGLEWVS
AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQDL
HGTSSLFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-854 (SEQ ID NO: 50)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCTCAGGATCG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
15 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
AGGATTTGCATGGTACTAGTTCTTTGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-855 (SEQ ID NO: 13)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFENTSMGWVRQAPGKGLEWVSR
IDPKGSHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQREL
GKSHFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-855 (SEQ ID NO: 51)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAGAATACGAG
TATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
5 CGTATTGATCCTAAGGGTAGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAA
TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACA
GCGTGAGTTGGGTAAGTCGCATTTTGA TACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-865 (SEQ ID NO: 14)

EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYEMTWVRQAPGKGLEWVSKI
DPSGRFTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRD L
QLFDYWGGQGLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-865 (SEQ ID NO: 52)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTCTAGTTATGA
GATGACTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
20 AAGATTGATCCTTCGGGTCGTTTTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA
TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGG

TCGGACGGATCTTCAGCTTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCA
CCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-866 (SEQ ID NO: 15)

5 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMRWARQAPGKGLEWVS
YITPKGDHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAESLH
NERVKHFDYWGGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-866 (SEQ ID NO: 53)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCGAATTATTG
GATGCGGTGGGCCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ATATATTACTCCTAAGGGTGATCATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
15 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGAAT
CGCTTCATAATGAGCGTGTTAAGCATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-874 (SEQ ID NO: 16)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYRMWWVRQAPGKGLEWVSV
IDSTGSATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQQAG
SAMGEFDYWGGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-874 (SEQ ID NO: 54)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACTAGTTATCG
TATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
5 GTTATTGATTCTACTGGTTCGGCTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA
TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACA
GCAGGCTGGGAGTGCGATGGGGGAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAAC
CCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-883 (SEQ ID NO: 17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVNYRMWWVRQAPGKGLEWVS
AISGSGDKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGL
SFDYWGGQGLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-883 (SEQ ID NO: 55)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGTTAATTATCGT
ATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
20 GCTATTAGTGGTAGTGGTGATAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA
TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACA

TGGGCTGTCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-903 (SEQ ID NO: 18)

5 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDMRMWWVRQAPGKGLEWVS
VINADGNRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGL
PFDYWGGQGLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-903 (SEQ ID NO: 56)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAATGATATGAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
AGTGATTAATGCTGATGGTAATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
15 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAG
ATGGGCTGCCTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC
GAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-4 (SEQ ID NO: 19)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYGMGWVRQAPGKGLEWVS
WIEKTGNKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGR
HIKVRSRDFDYWGQGLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-4 (SEQ ID NO: 57)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGACTTATGG
TATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
5 TGGATTGAGAAGACGGGTAATAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAG
CGGGGAGGCATATTAAGGTGCGTTCGAGGGATTTTGACTACTGGGGTCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-29 (SEQ ID NO: 20)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKRYSMGWVRQAPGKGLEWVSV
INDLGSLTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNISM
VRPGSWFDYWQGTLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-29 (SEQ ID NO: 58)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGAGGTATTC
TATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
20 GTTATTAATGATCTGGGTAGTTTGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA
TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGG

GAATATTAGTATGGTGAGGCCGGGGAGTTGGTTTGACTACTGGGGTCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-32 (SEQ ID NO: 21)

5 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFEYPMGWVRQAPGKGLEWVSV
ISGDGQRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSHTG
TVRHLETFDYWGGGTLTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-32 (SEQ ID NO: 59)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTTGAGTATCCT
ATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
GTTATTAGTGGGGATGGTCAGCGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
15 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAA
GTCATACGGGGACTGTGAGGCATCTGGAGACGTTTGACTACTGGGGTCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-62 (SEQ ID NO: 22)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQESMYWVRQAPGKGLEWVSA
ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGTR
IKQGFDYWGGGTLTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-62 (SEQ ID NO: 60)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGTCAGGAGAG
TATGTATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
5 GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAA
GTGGTACGCGGATTAAGCAGGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-71 (SEQ ID NO: 23)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMDYRMYWVRQAPGKGLEWVS
GIDPTGLRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIKW
GEMGSYKTFDYWGQGTLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-71 (SEQ ID NO: 61)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTATGGATTATAG
GATGTATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
20 GGGATTGATCCTACTGGTTTGCGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAA

TTAAGTGGGGGGAGATGGGGAGTTATAAGACTTTTGACTACTGGGGTCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-72 (SEQ ID NO: 24)

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMDYDMSWVRQAPGKGLEWVS
MIREDDGGKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARV
PYRRGHRDNFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-72 (SEQ ID NO: 62)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTATGGATTATGA
TATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
ATGATTCGTGAGGATGGTGGTAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
15 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAG
CGAGGGTGCCTTATCGGCGTGGGCATAGGGATAATTTTGACTACTGGGG
TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-81 (SEQ ID NO: 25)

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEPVIMGWVRQAPGKGLEWVSAI
EARGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPGRH
LSQDFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-81 (SEQ ID NO: 63)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCTTCCGGATTACCTTTGAGCCGGTTAT
TATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
5 AGCTATTGAGGCGCGGGGTGGGGGGACATACTACGCAGACTCCGTGAA
GGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA
AACCTGGGCGGCATCTTAGTCAGGATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAAC
CCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-99 (SEQ ID NO: 26)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYRMMWVRQAPGKGLEWVST
IDPAGMLTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRLAS
RSHFDYWGQGTLVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-99 (SEQ ID NO: 64)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATCGGTATCG
TATGATGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
20 ACGATTGATCCTGCTGGTATGCTTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA
TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAAG

GCTGGCTTCGCGGAGTCATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-101 (SEQ ID NO: 27)

5 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYDMAWVRQAPGKGLEWVSR
IRSDGVRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRAK
NGWFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-101 (SEQ ID NO: 65)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGCGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCTGAGTATGA
TATGGCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTTGAGTGGGTCTCA
CGGATTCGTTCTGATGGTGT TAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA
15 TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGA
TCGTGCTAAGAATGGTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCA
CCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-352 (SEQ ID NO: 28)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYKMAWVRQAPGKGLEWVSLI
FPNGVPTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYSGQ
GRDFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-352 (SEQ ID NO: 66)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATAAGTATAA
GATGGCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTC
5  ACTTATTTTTCCGAATGGTGTTCCTACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA
TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATAT
AGTGGTCAGGGGCGGGATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCA
CCGTCTCGAGC
```

10

Las CDRs, como es definido por Kabat, de estas secuencias guía sin afectación del dAb del TGFRII anti-humano y anti-murino, se muestran respectivamente en los cuadros 1 y 2 siguientes.

CUADRO 1**Secuencias de la CDR de los dAbs del TGFβRII anti-humano**

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
DOM23h-802	SEGTMW (SEQ ID NO: 77)	AILAAGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 113)	KRQERDGFYD (SEQ ID NO: 149)
DOM23h-803	SAGRMW (SEQ ID NO: 78)	AINRDGTRTYADSVKG (SEQ ID NO: 114)	HDDGHGNFDY (SEQ ID NO: 150)
DOM23h-813	TDDRMW (SEQ ID NO: 79)	AIQPDGHTTYADSVKG (SEQ ID NO: 115)	EQDVKGSSSFYD (SEQ ID NO: 151)
DOM23h-815	AEDRMW (SEQ ID NO: 80)	AIDPQGQHTTYADSVKG (SEQ ID NO: 116)	QSTGSATSDY (SEQ ID NO: 152)
DOM23h-828	MSYRMW (SEQ ID NO: 81)	AISPSGSDTYADSVKG (SEQ ID NO: 117)	QVVEYSRTHKGVFDY (SEQ ID NO: 153)
DOM23h-830	EGYRMW (SEQ ID NO: 82)	AIDSLGDRTYADSVKG (SEQ ID NO: 118)	QGLTHQSPSTFDY (SEQ ID NO: 154)
DOM23h-831	EAYKMT (SEQ ID NO: 83)	YITPSGGQTYADSVKG (SEQ ID NO: 119)	YGSSFDY (SEQ ID NO: 155)
DOM23h-840	GDGRMW (SEQ ID NO: 84)	AIEGAGSDTYADSVKG (SEQ ID NO: 120)	QASRNPFYD (SEQ ID NO: 156)

CUADRO 1 (CONTINUACIÓN)

	Clon	CDR1	CDR2	CDR3
5	DOM23h-842	DDSEMA (SEQ ID NO: 85)	LIRRNGNATYYADSVKG (SEQ ID NO: 121)	VTKDRSVLFDY (SEQ ID NO: 157)
	DOM23h-843	DQDRMW (SEQ ID NO: 86)	AIESGGHRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 122)	QNESGRSGFDY (SEQ ID NO: 158)
	DOM23h-850	DAARMW (SEQ ID NO: 87)	AIADIGNTTYADSVKG (SEQ ID NO: 123)	QSGSEDHFDY (SEQ ID NO: 159)
10	DOM23h-854	AQDRMW (SEQ ID NO: 88)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 124)	QDLHGTSSLFDY (SEQ ID NO: 160)
	DOM23h-855	ENTSMG (SEQ ID NO: 89)	RIDPKGSHTYYADSVKG (SEQ ID NO: 125)	QRELGKSHFDY (SEQ ID NO: 161)
15	DOM23h-865	RSYEMT (SEQ ID NO: 90)	KIDPSGRFTYYADSVKG (SEQ ID NO: 126)	GRTDLQLFDY (SEQ ID NO: 162)
	DOM23h-866	SNYWMR (SEQ ID NO: 91)	YITPKGDHTYYADSVKG (SEQ ID NO: 127)	SLHNERVKHFDY (SEQ ID NO: 163)
	DOM23h-874	TSYRMW (SEQ ID NO: 92)	VIDSTGSATYYADSVKG (SEQ ID NO: 128)	QQAGSAMGEFDY (SEQ ID NO: 164)
20	DOM23h-883	VNYRMW (SEQ ID NO: 93)	AISGSGDKTTYADSVKG (SEQ ID NO: 129)	HGLSFDY (SEQ ID NO: 165)

CUADRO 1 (CONTINUACIÓN)

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
DOM23h-903	NDMRMW (SEQ ID NO: 94)	VINADGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 130)	DGLPFDY (SEQ ID NO: 166)

5

CUADRO 2**Secuencias de la CDR de los dAbs del TGF β RII anti-murino**

10

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
DOM23m-4	TTYGMG (SEQ ID NO: 95)	WIEKTGNKTYYA DSVKG (SEQ ID NO: 131)	AGRHIKVRSRDF DY (SEQ ID NO: 167)
DOM23m-29	KRYSMG (SEQ ID NO: 96)	VINDLGSLTYAD SVKG (SEQ ID NO: 132)	GNISMVRPGSW FDY (SEQ ID NO: 168)
DOM23m-32	FEYPMG (SEQ ID NO: 97)	VISGDGQRTYYA DSVKG (SEQ ID NO: 133)	SHTGTVRHLETF DY (SEQ ID NO: 169)
DOM23m-62	GQESMY (SEQ ID NO: 98)	AISGSGGSTYYA DSVKGR (SEQ ID NO: 134)	SGTRIKQGFDY (SEQ ID NO: 170)
DOM23m-71	MDYRMY (SEQ ID NO: 99)	GIDPTGLRYYA DSVKG (SEQ ID NO: 135)	IKWGEMGSYKT FDY (SEQ ID NO: 171)
DOM23m-72	MDYDMS (SEQ ID NO: 100)	MIREDDGGKTYA DSVKGR (SEQ ID NO: 136)	ARVPYRRGHRD NFDY (SEQ ID NO: 172)
DOM23m-81	EPVIMG (SEQ ID NO: 101)	AIEARGGGTYA DSVKG (SEQ ID NO: 137)	PGRHLSQDFDY (SEQ ID NO: 173)

15

20

CUADRO 2 (CONTINUACIÓN)

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
DOM23m-99	DRYRMM (SEQ ID NO: 102)	TIDPAGMLTYYA DSVKG (SEQ ID NO: 138)	RLASRSHFDY (SEQ ID NO: 174)
DOM23m-101	SEYDMA (SEQ ID NO: 103)	RIRSDGVRTYYA DSVKG (SEQ ID NO: 139)	DRAKNGWFD Y (SEQ ID NO: 175)
DOM23h-352	DKYKMA (SEQ ID NO: 104)	LIFPNGVPTYA NSVKG (SEQ ID NO: 140)	YSGQGRDFD Y (SEQ ID NO: 176)

EJEMPLO 2**DSC (calorimetría de barrido diferencial) – clones sin afectación**

Se determinó la estabilidad térmica de los dAbs usando calorimetría de barrido diferencial (DSC). Los dAbs fueron dializados durante la noche en PBS hasta una concentración final de 1 mg/ml. El regulador de pH de diálisis se usó como referencia para todas las muestras. Se llevaron a cabo mediciones de la DSC usando el microcalorímetro de celda capilar GE HEALTHCARE™-MICROCAL™VP-DSC, a una tasa de calentamiento de 180°C/hora. Una escala de exploración típica fue de 20 a 90°C para el regulador de pH de referencia y la muestra de proteína. Una reexploración se llevó a cabo cada vez para evaluar el grado de repliegue de la proteína bajo estas condiciones experimentales. Después de la exploración de cada

muestra de proteína, la celda capilar se limpió con una solución de DECON™ a 5% (Fisher-Scientific) en agua, seguido de una exploración de la PBS. Los trazos de los datos resultantes se analizaron usando el software Origin 7.0. El trazo de la DSC obtenido a partir de la exploración del regulador de pH de referencia se sustrajo del trazo de la exploración de la muestra de proteína. La
5 concentración molar precisa de la muestra de proteína se ingresó en la rutina del análisis de datos para dar valores para los valores de temperatura de fusión (T_m), entalpía (ΔH) y entalpía de Van't Hoff (ΔH_v). Los datos se ajustaron a un modelo no de 2 estados (N2M). El mejor ajuste se obtuvo con 1
10 o 2 eventos de transición. Los valores de la T_m obtenidos para los dAbs descritos en esta patente, variaron de 52.1 °C a 73.3 °C. Los valores de la T_m y el porcentaje de repliegue, se muestran en el cuadro 3.

CUADRO 3

5	Nombre del dAb	Tm aparente de la DSC °C			% de repliegue
		transición 1 N2M	transición 2 N2M		
		Tm	Tm1	Tm2	
10	DOM23h-802	-	56.28	57.54	0
	DOM23h-803	-	61.19	64.59	23
	DOM23h-813	52.11	-	-	100
	DOM23h-815	65.13	-	-	93
	DOM23h-828	-	60.86	59.40	0
	DOM23h-830	-	57.01	58.15	0
	DOM23h-831	-	55.29	57.19	0
	DOM23h-840	63.70	-	-	100
	DOM23h-842	63.08	-	-	27
	DOM23h-843	60.15	-	-	60
15	DOM23h-850	58.27	-	-	60
	DOM23h-854	-	55.31	58.20	30
	DOM23h-855	70.32	-	-	88
	DOM23h-865	63.02	-	-	0
	DOM23h-866	-	52.88	55.77	18
20	DOM23h-874	-	58.83	60.15	0
	DOM23h-883	-	66.78	59.14	0
	DOM23h-903	-	59.11	61.98	24
	DOM23m-4	-	57.1	61.3	0
	DOM23m-29	68	-	-	0

CUADRO 3 (CONTINUACIÓN)

5	DOM23m-32	-	70.4	73.3	25
	DOM23m-62	-	-	-	-
	DOM23m-71	63	-	-	0
	DOM23m-72	-	-	-	-
	DOM23m-81	-	-	-	-
10	DOM23m-99	-	58.5	59	0
	DOM23m-101	64	-	-	30
	DOM23m-352	66	-	-	50

Todas las moléculas mantienen la estructura terciaria hasta por lo menos 52°C tras el calentamiento.

15

EJEMPLO 3**SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser de ángulos múltiples) – clones sin afectación**

Para determinar si los dAbs son monoméricos o forman oligómeros de mayor orden en solución, se analizaron mediante SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser de ángulos múltiples). Un sistema de CLAR serie 1100 de Agilent con un cargador automático de muestras y un detector UV (controlado por el software

Empower) se conectó al detector Wyatt Mini Dawn Treos (dispersión de luz láser (LS)) y el detector Wyatt Optilab rEX DRI (índice de refracción (RI) diferencial). Los detectores se conectaron en el siguiente orden -UV-LS-RI. Los instrumentos RI y LS operan a una longitud de onda de 658 nm; la señal UV se monitoreó a 280 nm y 220 nm. Se separaron los anticuerpos de dominio (100 microlitros de inyección a una concentración de 1 mg/mL en PBS), de acuerdo con sus propiedades hidrodinámicas mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna GE HEALTHCARE™ 10/300 Superdex 75. La fase móvil fue PBS más etanol a 10%. La intensidad de la luz dispersa mientras la proteína se hizo pasar a través del detector, se midió como una función del ángulo. Esta medición tomada en conjunto con la concentración de proteína determinada usando el detector RI, permitió el cálculo de la masa molar usando ecuaciones apropiadas (parte integral del software de análisis Astra v.5.3.4.14). Todos los dAbs descritos en la presente tienen un contenido monomérico que varía de 65% a 98%. Los datos se muestran en el cuadro 4.

CUADRO 4

	Nombre del dAb	Monómero mediante SEC-MALLS (%)
5	DOM23h-802	92.5
	DOM23h-803	96.4
	DOM23h-813	96.6
	DOM23h-815	98
	DOM23h-828	80
10	DOM23h-830	65
	DOM23h-831	72
	DOM23h-840	91
	DOM23h-842	91.6
	DOM23h-843	90.2
15	DOM23h-850	97.7
	DOM23h-854	83.4
	DOM23h-855	96.3
	DOM23h-865	83
	DOM23h-866	92.4
20	DOM23h-874	92.6
	DOM23h-883	93.5
	DOM23h-903	96.5
	DOM23m-4*	93
	DOM23m-29*	95
	DOM23m-32*	92
	DOM23m-62	No determinado
	DOM23m-71*	88

CUADRO 4

5

Nombre del dAb	Monómero mediante SEC-MALLS (%)
DOM23m-72	No determinado
DOM23m-81	No determinado
DOM23m-99	79
DOM23m-101	77.4
DOM23m-352	93

*Estos dAbs se hicieron correr usando el mismo plan de SEC-MALLS como se describió anteriormente, salvo que el sistema de CLAR usado fue un sistema Shimadzu LC-20AD Prominence. Estos dAbs se hicieron correr también sobre una columna Superdex75, pero el regulador de pH de la fase móvil fue PBS.

Las moléculas enlistadas en los cuadros 3 y 4 se eligieron sobre la base del contenido de estado en solución (propensión para formar monómeros) y estabilidad térmica. Todas las moléculas muestran una propensión $\geq 65\%$ para mostrar monomerización, y mantienen la estructura terciaria hasta por lo menos 52 °C tras el calentamiento.

EJEMPLO 4

Pruebas para la inhibición del TGFβRII (clones sin afectación)

Prueba de luciferasa MC3T3-E1 – método m1

5 La prueba de luciferasa MC3T3-E1 mide la capacidad de los dAbs para inhibir la expresión de la CAGA-luciferasa inducida por el TGFβ en células MC3T3-E1. Tres copias de un motivo de secuencia sensible al TGFβ, denominado una caja CAGA, están presentes en el promotor PAI-1 de humano y específicamente se une a las proteínas Smad3 y 4. La clonación de
10 copias múltiples de la caja CAGA en una construcción de reportero de luciferasa, confiere sensibilidad del TGFβ a las células transfectadas con el sistema de reportero. Esta prueba usa células MC3T3-E1 (osteoblastos de ratón) transfectadas establemente con una construcción de reportero de [CAGA]₁₂-luciferasa (Dennler, *et al.* (1998) EMBO J. 17, 3091–3100).

15 Se pusieron a prueba dAbs solubles por su capacidad para bloquear la señalización del TGF-β1 por medio de la vía Smad3/4.

 El protocolo usado para generar los datos que aparecen como método m1 en el cuadro 5, es el siguiente. En resumen, 2.5 x 10⁴ células MC3T3-E1 por cavidad en medio de prueba (medio del RPMI (Gibco,
20 Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido), suero de ternera fetal a 10% inactivado con calor, y penicilina a 1%/estreptomicina), se añadieron a una placa de cultivo de tejidos de 96 cavidades (Nunc), seguido por el dAb y el TGF-β1 (concentración final de 1 ng/ml), y se incubaron por seis horas a 37°C, CO₂ a

5%. Los dAbs fueron dializados en PBS antes de que fuesen puestos a prueba en la prueba. Se añadió el reactivo de luciferasa BRIGHTGLOW™ (Promega, Reino Unido) a las cavidades, y se incubaron a temperatura ambiente por dos minutos para permitir que las células fuesen lisadas, y la
 5 luminiscencia resultante se midió en un luminómetro.

La prueba se llevó a cabo veces múltiples para obtener un promedio y la escala de valores del % de inhibición máxima que se resumen en el cuadro 5. Este método ha sido modificado y se describe a continuación.

10 Prueba modificada de luciferasa MC3T3-E1 – método m2

Se añadieron células MC3T3-E1 a placas de 96 cavidades (Nunc 13610) a 1.25×10^4 por cavidad en “medio de siembra” (MEM-alfa + ribonucleósidos + desoxirribonucleósidos (Invitrogen 22571), FCS destilado con carbón vegetal a 5% (Perbio Sciences UK Ltd; SH30068.03), 1/100 de
 15 piruvato de sodio (Invitrogen 11360), 250 µg/ml de geneticina, 50 mg/ml (Invitrogen, 10131027), y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ a 5%. El medio de las células se reemplazó con “medio de prueba” (DMEM (Invitrogen 31966021), Hepes 25 mM (Invitrogen)), y los dAbs purificados en PBS a 4x concentración de prueba final se titularon en el “medio de prueba” y se
 20 añadieron a las placas de células, seguido del TGF-β1 (R&D, 240B) a 4x la EC80. Las placas se incubaron por seis horas a 37 °C, CO₂ a 5%. Se añadió el reactivo de luciferasa STEADYLITE™ (PerkinElmer 6016987) a las cavidades,

y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos, y la luminiscencia resultante se midió en el lector de placas ENVISION™.

Cada dAb se tituló por duplicado en la prueba, y se determinó un % de inhibición máxima (n=2). La prueba se llevó a cabo veces múltiples para
5 obtener un promedio y la escala de valores del % de inhibición máxima que se resumen en el cuadro 5. Se cubrieron los parámetros de control de calidad de la prueba: pequeña molécula interna que muestra una escala de IC50 de 100 a 900 nM para las pruebas en ratones. Asimismo, los factores Z robustos fueron mayores de 0.4, y la EC80 del TGF- β estuvo dentro de 6 veces la
10 concentración añadida a la prueba.

Prueba de liberación de IL-11 de células A549 – h1

La prueba de liberación de interleucina-11 (IL-11) de células A549, mide la capacidad de los dAbs para inhibir la liberación de IL-11
15 estimulada por el TGF- β 1 de humano a partir de células A549. El TGF- β 1 se une directamente al TGF- β RII e induce el ensamble del complejo TGF- β RI/II. El TGF- β RI es fosforilado y es capaz de señalizar a través de varias vías que incluyen la vía Smad4. La activación de la vía Smad4 resulta en la liberación de IL-11. La IL-11 se secreta en el sobrenadante de células y se mide
20 entonces mediante ELISA colorimétrica.

Se pusieron a prueba dAbs solubles por su capacidad para bloquear la señalización del TGF- β 1 por medio de la vía Smad4. En resumen, 1×10^5 células A549 por cavidad en “medio de prueba” (medio DMEM de alto

contenido de glucosa (Gibco™, Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido), suero de
 ternera fetal a 10% inactivado con calor (PAA, Austria), HEPES 10 mM
 (Sigma, Reino Unido) y penicilina a 1%/estreptomicina (PAA, Austria)), se
 añadieron a una placa de cultivo de 96 cavidades (Nunc), seguido por el dAb y
 5 el TGF-β1 (concentración final de 3 ng/ml) (R&D Systems, Abingdon, Reino
 Unido), y se incubaron durante la noche a 37°C, CO₂ a 5%. Los dAbs fueron
 dializados en PBS antes de que fuesen puestos a prueba. La concentración
 de IL-11 liberada en el sobrenadante se midió usando un DUOSET™ para IL-
 11 de humano (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), de acuerdo con las
 10 instrucciones del fabricante.

La prueba de liberación de IL-11 de células A549 es referida en
 los cuadros 5 y 6 como método de prueba h1. La prueba se llevó a cabo
 veces múltiples para obtener un promedio y la escala de valores del % de
 inhibición máxima que se resumen en el cuadro 5. Se cubrieron los
 15 parámetros de control de calidad de la prueba: pequeña molécula interna que
 muestra una escala de IC50 de 50 a 500 nM para las pruebas en humanos.

Prueba del sensor de células HEK 293T SBE-bla – h2

Los miembros de la familia Smad de moléculas de transducción
 20 de señales, son componentes de una vía intracelular que permite que el TGF-
 β señalice de la superficie de la célula hacia el núcleo. El TGF-β1 se une
 directamente al TGF-βRII, e induce el ensamble del complejo TGF-βRI/II.
 Smad2 y Smad3 son fosforiladas entonces por el TGF-βRI, y forman

posteriormente un complejo heteromérico con el miembro de la co-familia smad Smad4. Estos complejos son translocados hacia el núcleo, en donde se unen al ADN y regulan la transcripción génica.

Las células HEK 293T del sensor de células SBE-bla contienen
5 un gen reportero de beta-lactamasa bajo el control del elemento de unión Smad (SBE), el cual fue integrado establemente en células HEK 293T (Invitrogen, Reino Unido). Las células son sensibles al TGF- β I, y pueden usarse para detectar agonistas/antagonistas de la vía de señalización Smad2/3.

10 Se pusieron a prueba dAbs solubles por su capacidad para bloquear la señalización del TGF- β 1 por medio de esta vía siguiendo el siguiente método, el cual se basó en un método optimizado de Invitrogen, Reino Unido (línea de células K1108).

La prueba se llevó a cabo directamente a partir de células
15 congeladas que se habían cultivado por cuando menos 4 pasajes en medio de crecimiento (DMEM de alto contenido de glucosa, Invitrogen 21068028, FBS a 10% dializado, Invitrogen 26400-044, aminoácidos no esenciales 0.1 mM (1/100), Invitrogen 11140-050, regulador de pH HEPES 25 mM (1/40), Sigma H0887, piruvato de sodio 1 mM (1/100), Invitrogen 11360-070, GLUTAMAX™
20 a 1% (200 mM, Invitrogen 35050038), 5 μ g/ml de blasticidina, Invitrogen R21001), y congeladas internamente (a 4×10^7 /ml). Las células se sembraron a 20,000 células por cavidad en placas de cultivo de células (Costar 3712) en medio de siembra (como anteriormente con FCS a 1% y sin blasticidina).

Después de incubación de las células durante la noche, los dAbs purificados fueron diluidos en “medio de prueba” (DMEM (Invitrogen 31966021), Hepes 25 mM (Invitrogen), y se añadieron a las células a 4x la concentración de prueba final. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se añadió TGF- β (R&D Systems; 240B) a 4x la EC80, y se incubó por otras 5 horas. El substrato LIVEBLAZER™ (Invitrogen K1030) se obtuvo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se añadió a 8x el volumen. Las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 16 horas y se leyeron en un lector de placas ENVISION™, de acuerdo con el protocolo de
5
10

La prueba SBE-bla HEK CELLSSENSOR™ es referida en los cuadros 5 y 6 como método h2. Cada dAb fue titulado por duplicado en una prueba y se determinó una IC50, y se determinó el % de inhibición máxima (n=2). Debido a la dificultad para obtener curvas completas en la prueba en
15
20

ratones, sólo se cita el % de inhibición en el cuadro 5. La prueba se llevó a cabo veces múltiples hasta obtener un promedio y una escala de valores que se resumen en los cuadros 5 y 6. Se calculó la media aritmética IC50 usando pIC50's (-log de IC50), y la escala se calculó añadiendo y sustrayendo el logaritmo de la desviación estándar de la pIC50 media, y transformando entonces de nuevo hasta la IC50. Se cubrieron los parámetros de control de calidad de la prueba: pequeña molécula interna que muestra una escala de IC50 de 50 a 500 nM para las pruebas en humanos. Asimismo, los factores Z

robustos fueron mayores de 0.4, y la EC80 del TGF- β estuvo dentro de 6 veces la concentración añadida a la prueba.

Los resultados se muestran en los cuadros 5 y 6.

5

CUADRO 5

Datos de prueba funcionales en células para clones específicos de ratón **más dAb sustituto de VH**

10

15

20

Prueba de células 3T3 de ratón						Prueba de liberación de IL-11 humana (h1) o SBE-bla HEK CELLSSENSOR™ (h2)				
		% de inhibición máxima					% de inhibición máxima			
	Método de prueba	Promedio	SD	escala	n	Método de prueba	Promedio	SD	escala	n
DOM23 m-04	m1	73.3	8.4	68.8 - 83	3	h1	70.7	6.4	67 - 78	3
DOM23 m-04						h2	69.0			1
DOM23 m-29	m1	54.2	5.2	50.5 - 57.9	2					
DOM23 m-32	m1	39.7	4.0	36.9 - 42.5	2					
DOM23 m-62	m1	78.6			1	h1	79.0			1
DOM23 m-71	m1	44.9	9.3	38.3 - 51.4	2	h1	-2.0			1
DOM23 m-72	m1	17.5	24.7	0 - 34.9	2	h1	1.7			1
DOM23 m-81	m2	30.3	11.5	21 - 47	4					
DOM23 m-99	m2	46.5	28.0	26.7 - 93.5	6					
DOM23 m-101	m2	48.0	19	22.0 - 74.1	12	h2	59.8	27.0	17 - 81	5
DOM23 h-352	m2	48.0	23.9	16.8 - 78.9	16	h2	46.7	36.5	5.7 - 86	5
VH DU M-2	m2	21.4	13.2	21 - 33.9	15	h2	46.0	29.6	17 - 84	6
VH DU M-2	m1	22.5	0	22.5	2					

CUADRO 6**Datos funcionales en células para clones específicos de humano más****dAb sustituto de VH**

5		dAb	IC50 nM			
	Método de prueba		Valor medio		Escala de la IC50 (+/- log SD)	n
10	h2	DOM23h-802	>	11062	6592 - 18562	6
	h2	DOM23h-803	>	11619	5890 - 22922	6
	h2	DOM23h-813	>	9328	4301 - 20230	6
	h2	DOM23h-815		7122	3026 - 16764	4
	h2	DOM23h-828		9899.07	4441 - 22065	4
	h2	DOM23h 830		6299	5442 - 7291	4
	h2	DOM23h-831	>	3126	534 - 18291	8
	h2	DOM23h 840		2915	650 - 13081	7
	h2	DOM23h 842		2042	2223 - 18704	4
	h2	DOM23h-843	>	9007	3396 -23894	8
	h2	DOM23h-850		5350	2358 - 12137	6
	h2	DOM23h-854	>	9551	3085 - 29569	8
	h2	DOM23h-855	>	4467	1088 - 18339	8
	h2	DOM23h 865		5559	1070 - 28893	4
	h2	DOM23h 866	>	1762	195 - 15900	6
15	h2	DOM23h 874	>	925	89 - 9591	6
	h2	DOM23h 883		10123	60 - 17344	6
	h2	DOM23h 903		1048	492 - 223	5
	h2	VHsustituto2	>	25119	25000-250000	12

Los clones de ratón se seleccionaron sobre la base de que mostraron más de 40% de neutralización del TGF- β en varias pruebas. La única excepción a esto fue DOM23m-72. Los clones mostraron también buenas curvas de neutralización (datos no mostrados). Los clones de humano se seleccionaron sobre la base de que los valores de la IC50 promedio fueron menores de 15 μ M.

EJEMPLO 5

Maduración por afinidad propensa a error de clones sin afectación (del ejemplo 1)

5 Se llevó a cabo mutagénesis propensa a error para mejorar la afinidad de los dAbs identificados como activos con características biofísicas adecuadas (descritas anteriormente).

 Construcción de la colección de fagos: Se obtuvieron colecciones propensas a error de DOM23h-843, DOM23h-850, DOM23h-854,
10 DOM23h-855, DOM23h-865, DOM23h-866, DOM23h-874, DOM23h-883, DOM23h-439 y DOM23h-903, usando el kit de mutagénesis aleatoria GENEMORPH™ II (Stratagene, No. de catálogo 200550). Los genes del dAb objetivo fueron amplificados mediante PCR usando ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* y los oligonucleótidos DOM008 (5'-
15 AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3' (SEQ ID NO: 185)) y DOM009 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3' (SEQ ID NO: 186)), seguido de reamplificación del producto de PCR diluido con los oligonucleótidos DOM172 (5' TTGCAGGCGTGGCAACAGCG-3' (SEQ ID NO: 187)) y DOM173 (5'-CACGACGTTGTAAAACGACGGCC-3' (SEQ ID NO: 188)) y la ADN
20 polimerasa MUTAZYME™ II, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este producto de PCR fue amplificado adicionalmente usando ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* y los oligonucleótidos DOM172 y DOM173, para incrementar el rendimiento del producto de ADN. El producto de la PCR

fue digerido con las endonucleasas de restricción Sal I y Not I. El producto no digerido y los extremos digeridos fueron removidos del producto digerido usando perlas de estreptavidina (Dynal Biotech, Reino Unido). Para las selecciones propensas a error anti-humano, el producto digerido fue ligado en el vector del fago pDOM4 digerido con las endonucleasas de restricción Sal I y Not I, y se usó para transformar las células TB1 de *E. coli*. Las células transformadas se sembraron en agar 2xTY complementado con 15 µg/ml de tetraciclina, dando tamaños de colección $>1 \times 10^7$ transformantes.

Selecciones propensas a error de dAb específicas del TGFbetaRII de humano: Se llevaron a cabo tres rondas de selección con las colecciones DOM23h-843, DOM23h-850, DOM23h-854, DOM23h-855, DOM23h-865, DOM23h-866, DOM23h-874, DOM23h-883, DOM23h-903 y DOM23h-439. La ronda uno se llevó a cabo usando TGFbetaRII/Fc 1 nM biotinilado de humano (N13241-57). Dos métodos diferentes se siguieron para las rondas dos y tres, el método 1 usando la forma dimérica del TGFbetaRII/Fc del antígeno, y el método 2 usando la forma monomérica soluble del TGFbetaRII. Método 1: La ronda dos se llevó a cabo con TGFbetaRII/Fc 1 nM biotinilado de humano con el competidor TGFbetaRII/Fc 1 µM no biotinilado de humano. La ronda tres se llevó a cabo con TGFbetaRII/Fc 100 pM biotinilado de humano con TGFbetaRII/Fc 1 µM no biotinilado de humano (N12717-4). Método 2: La ronda dos se llevó a cabo con TGFbetaRII 1 nM biotinilado de humano con el competidor TGFbetaRII 1 µM no biotinilado de humano. La ronda tres se llevó a cabo con TGFbetaRII

100 pM biotinilado de humano con el competidor TGFbetaRII 1 μ M no biotinilado de humano.

Los productos de la segunda y tercera rondas de selección fueron subclonados en el vector pDOM13, como se describió anteriormente.

- 5 Los clones individuales fueron seleccionados y expresados en placas de 96 cavidades a 850 rpm, 37°C por 24 horas, 90% de humedad en 0.5 ml/cavidad de medio de autoinducción rápida la noche anterior complementado con 100 μ g/ml de carbenicilina. Las placas se centrifugaron entonces a 1800 g por 10 minutos. Los sobrenadantes se diluyeron a 1/5 o 1/2 en regulador de pH de
- 10 HBS-EP y se tamizaron sobre BIACORE™ para unión al TGF- β RII/Fc biotinilado de humano (chip de SA recubierto con 1000 Ru de hRII-Fc biotinilado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante) (BIACORE™, GE HEALTHCARE™). Las muestras se hicieron correr sobre BIACORE™ a una magnitud de flujo de 50 μ l/min. Los clones que se unieron con un alto
- 15 número de unidades de resonancia (RUs) o con una constante de velocidad de disociación mejorada en comparación con el clon precursor, fueron expresados en 50 ml de medio de autoinducción rápida la noche anterior a 30°C por 48 a 72 horas y centrifugados a 4,600 rpm por 30 minutos. Los sobrenadantes se incubaron durante la noche a 4°C con perlas de
- 20 STREAMLINE™-proteína A. Las perlas se empacaron entonces en columnas de goteo, se lavaron con 5 volúmenes de columna de 2xPBS, seguido de un volumen de lecho de Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, y los dAbs unidos fueron eluidos con glicina-HCl 0.1 M, pH 2.0 y neutralizados con Tris-HCl 1 M, pH

8.0. La DO de los dAbs a 280 nm se midió, y se determinaron las concentraciones de proteína usando coeficientes de extinción calculados a partir de las composiciones de aminoácidos de los dAbs.

5 Análisis *in vitro* de las selecciones propensas a error con
 constante de velocidad de disociación mejorada: Los dAbs purificados se
 sometieron a las mismas pruebas como aquellos de las selecciones sin
 afectación, a saber, Biacore, prueba del sensor de células HEK 293T SBE-bla
 (h2), DSC y SEC-MALLS. Ejemplos de los clones mejorados sobre el
 precursor se muestran en el cuadro 6A. Los valores de la IC50 son un valor
 10 promedio de “n” número de experimentos.

CUADRO 6A

15

DOM23h	Constante de velocidad de asociación ka1 (1/Ms)	Constante de velocidad de disociación kd1 (1/s)	KD de Afinidad	Veces la mejora de la ka	Veces la mejora de la kd	Veces la mejora de la KD	IC50 promedio (nM)*
439	2.08E+06	5.02E-02	2.42E-08				3570 (3)
439-20	4.43E+06	3.54E-03	7.99E-10	2.1	14.2	30.3	48 (10)
843	9.05E+05	3.43E-01	3.78E-07				1947 (3)
843-13	5.11E+06	2.11E-02	4.13E-09	5.6	16.2	91.7	540 (4)
855	3.35E+05	3.15E-01	9.41E-07				>25000 (3)
855-21	1.86E+06	3.36E-02	1.80E-08	5.6	9.4	52.3	18580 (6)

* El número de experimentos para el cálculo de los valores de la IC50 promedio, se da entre paréntesis.

Secuencias maduras por afinidad

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-855-21 (SEQ ID NO:
203)

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAGAATACGAG
TATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA
CGTATTGATCCTAAGGGTAGTCATACATACTACACAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAA
10 TGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACA
GCGTGAGTTGGGTAAGTCGTATTTTGA TACTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-855-21 (SEQ ID NO:
15 204)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFENTSMGWVRQAPGKGLEWVSR
IDPKGSHTYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQREL
GKSYFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-843-13 (SEQ ID NO:

205)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATCAGGATCG
5  GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
   AGCTATTGAGAGTGGTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
   GGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
   AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAT
   CAGAATAAGTCGGGGCGTTCTGGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCC
10  TGGTCACCGTCTCGAGC
```

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-843-13 (SEQ ID NO:

206)

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDQDRMWWVRQAPGKGLEWVS
15  AIESGGHRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANQNK
   SGRSGFDYWQGQGLVTVSS
```

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-20 (SEQ ID NO:

207)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC
20  AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCTC
```

ACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
 GGCCGGTTCAACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 CGGCATGCGGCTGGGGTTTCGGGTACTTATTTTGACTIONGGGGTCAGG
 5 GAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-20 (SEQ ID NO:
 208)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSR
 10 IDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRHAA
 GVSGTYFDYWGQGTLVTVSS

EJEMPLO 6

Maduración por afinidad del linaje DOM23h-271-7

15

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271 (SEQ ID NO: 199)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
 IEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGR
 KWTANSRFDYWGQGTLVTVSS

20

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271 (SEQ ID NO: 200)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
5 AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
AGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGGG
TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-7 (SEQ ID NO: 201)

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
IEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGR
KWTANSRFDYWQGGLTVTVSS

15

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-7 (SEQ ID NO:
202)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
20 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA

ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
 AGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGGG
 TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

El anticuerpo de dominio DOM23h-271 (SEQ ID NO: 199) había
 5 sido aislado de las colecciones de fagos en una campaña de selección previa,
 y el DOM23h-271-7 (SEQ ID NO: 201) variante se aisló después de la
 maduración por afinidad propensa a error, como se describe en el documento
 WO 2011/012609. Se seleccionó a DOM23h-271-7 (SEQ ID NO: 201) para
 más maduración por afinidad con base en su cinética de unión, secuencia y
 10 comportamiento biofísico. Se llevó a cabo la maduración por afinidad usando
 mutagénesis degenerada para re-diversificar las CDRs, y se identificaron las
 secuencias guía mejoradas usando exhibición de ADN o exhibición de fagos.
 Dos tipos de colecciones se construyeron para re-diversificar las CDRs, y
 éstas son referidas como colecciones de tripletes y mezcladas. Para obtener
 15 las colecciones de tripletes, se designó que los oligonucleótidos iniciadores
 abarcaran cada CDR, y dentro de cada iniciador los codones para tres
 aminoácidos fueron reemplazados con codones de NNS, de modo que tres
 posiciones fuesen diversificadas. Se usaron oligonucleótidos múltiples para
 abarcar todos los aminoácidos elegidos como objetivo dentro de cada CDR: 2
 20 para la CDR1, 3 para la CDR2 y 6 para la CDR3. Se usaron oligonucleótidos
 iniciadores complementarios para amplificar un fragmento de secuencia que
 contenía cada CDR mutada, y también un fragmento de secuencia traslapante
 que abarcaba el resto de la secuencia codificante del dAb. Estos fragmentos

se mezclaron y se ensamblaron mediante PCR traslapante de extensión por empalme para producir la secuencia codificante del dAb de longitud completa. Este producto fue amplificado por PCR usando los iniciadores DOM172 (SEQ ID NO: 187) y DOM173 (SEQ ID NO: 188), digerido con Sall y NotI, y ligado

5 en pDOM4 cortado de igual manera (descrito anteriormente) para las selecciones de fagos, o pIE2A2 (descrito en el documento WO2006018650) para las selecciones de exhibición de ADN. Las colecciones mezcladas se construyeron usando un método similar, esencialmente como se describe en el documento WO2006018650. Un oligonucleótido iniciador degenerado

10 individual se usó para cubrir todas las mutaciones dentro de cada CDR. Dentro de cada iniciador, los aminoácidos por ser diversificados fueron especificados usando codones degenerados que especifican aminoácidos múltiples. Cinco aminoácidos fueron diversificados en la CDR1, 7 en la CDR2 y 13 en la CDR3. En los iniciadores, se usó la siguiente codificación

15 degenerada: 'a' = 91% de A + 3% de T + 3% de G + 3% de C; 'g' = 91% de G + 3% de T + 3% de C + 3% de A; 'c' = 91% de C + 3% de T + 3% de G + 3% de A; 't' = 91% de T + 3% de A + 3% de G + 3% de C; 'S' = 50% de G y 50% de C. Las letras mayúsculas indican 100% del nucleótido especificado. Los iniciadores usados fueron:

20 271-7R1deg CDR1

(GCAGCCTCCGGATTACCTTTacSgaStatagSATGtgSTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGG) (SEQ ID NO: 189);

271-7R2deg CDR2

(GGGTCTCGAGTGGGTCTCAgcSATTgaScsSatSggSaaScgSACATACTACG
CAGACTCCGTG) (SEQ ID NO: 190);

271-7R3deg CDR3:

(GCGGTATATTACTGTGCGAAcaSatScsSggScgSaaStgSacSgcSaaStcScgS
5 ttS GACTACTGGGGTCAGGG) (SEQ ID NO: 191).

Los iniciadores degenerados de la colección se usaron de la misma manera como los iniciadores de tripletes. Cada CDR diversificada fue amplificada por separado, y combinada entonces con un fragmento de secuencia precursor usando traslape de extensión por empalme. Los
10 fragmentos fueron subclonados con pDOM4 y pIE2A2 usando Sall y NotI.

Exhibición de ADN

Se llevaron a cabo selecciones usando compartimentación *in vitro* en emulsiones y exhibición de ADN usando la proteína de unión al ADN
15 scArc esencialmente como se describe en el documento WO2006018650. En resumen, el antígeno del TGFbRII-FC fue biotinilado usando una relación molar 5:1 de biotina y el kit EZ-LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo #21327). Un fragmento de ADN que contiene las secuencias del operador de Arc y el cassette de expresión que contiene la colección del dAb diversificada,
20 fue amplificado por PCR a partir del vector pIE2A2 usando iniciadores de flanco. El producto se purificó a partir de un eGel (Invitrogen), y se diluyó hasta 1.7 u 0.85 nM en 1 mg/ml de BSA. Para la selección de los enlazadores mejorados, las colecciones mezcladas y de tripletes se procesaron por

separado bajo condiciones ligeramente diferentes. Las colecciones de tripletes de la CDR se combinaron para dar las colecciones agrupadas de la CDR 1, 2 ó 3. Se usaron diez rondas de selección para cada tipo de colección. Para ambos métodos, después de 2 ciclos de selección, las CDRs diversificadas se
5 amplificaron y recombinaron mediante PCR traslapante de extensión por empalme, para producir una cuarta colección con mutaciones en las 3 CDRs.

Para las colecciones mezcladas, 5×10^8 copias de ADN se mezclaron con 50 μ l de la mezcla de traducción *in vitro* EXPRESSWAY™ (Invitrogen). Cada reacción contenía 10.00 μ l de extracto SLYD™; 10.0 μ l de
10 2.5x regulador de pH de reacción; 12.5 μ l de 2x regulador de pH de alimentación; 1.0 μ l de metionina (75 mM); 1.25 μ l de mezcla de aminoácidos (50 mM); 15 μ l de H₂O; 0.5 μ l de polimerasa de T7; 0.25 μ l de mAb anti-HA 3F10 (Roche, No. de catálogo 1 867 423); y 1.5 μ l de glutatión (100 mM) (Sigma). Esto se añadió a 800 μ l de la fase hidrofóbica (SPAN™-80 a 4.5%,
15 (Fluka) + Triton X-100 a 0.5% (Sigma) en aceite mineral blanco ligero (Sigma)) en un vial de vidrio de 4 ml (CHROMACOL™ 4SV P837), y se agitó a 2000 rpm por 4 a 5 minutos. Los tubos se sellaron y se incubaron por 3 horas a 30°C. Todos los pasos subsiguientes se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Para extraer los complejos de ADN-proteína, 200 μ l de regulador de
20 pH C+ (Tris 10 mM, KCl 0.1 M, TWEEN™-20 a 0.05%, MgCl₂ 5 mM, BSA a 1%, pH 7.4) y 500 μ l de hexano se añadieron al vial, se mezclaron y se transfirieron a un microtubo y se centrifugaron a 13000 g por 1 minuto. La fase orgánica se removió, y la fase acuosa se volvió a extraer con 800 μ l de

hexano 3 a 5 veces más hasta que la zona interfacial fuese casi clara. Para las primeras 5 rondas de selecciones, el TGFbRII-FC biotinilado fue pre-unido a DYNAbeads™ de estreptavidina (Invitrogen) y añadido a los complejos extraídos para dar una concentración de antígeno equivalente a 40, 40, 10, 5 y 5 nM (rondas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). Las perlas T1 se usaron para las selecciones 1 a 3, y C1 para las selecciones 4 y 5. Después de 30 minutos de incubación, las perlas se lavaron 3 a 5 veces con regulador de pH C+. Los complejos de ADN que quedaron unidos a las perlas se recuperaron entonces mediante PCR con iniciadores de flanco. Las rondas de selección 6 a 10 fueron referidas como selecciones “solubles”, en donde el TGFbRII-FC biotinilado se añadió directamente a los complejos después de la extracción para dar una concentración de 5, 5, 4, 5 y 5 nM (rondas 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente), y se incubaron por 30 minutos para permitir que la unión se estableciera. El TGFbRII-FC no biotinilado se añadió entonces como un competidor a 74, 750, 400, 250 y 250 nM (rondas 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente), y se incubó por 15, 15, 30, 30 y 30 minutos (rondas 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente). En las rondas 9 y 10, un oligonucleótido de doble cadena que contenía a la secuencia del operador ARC se incluyó a 50 nM en el regulador de pH C+ usado en las extracciones con hexano para reducir las reacciones cruzadas entre cualquier ADN no complejo y el exceso de proteína liberada de las emulsiones. Después del período de competencia, se añadieron 10 µl de DYNAbeads™ de estreptavidina C1. Después de 10 minutos, las perlas se lavaron 5 veces con regulador de pH C+, y los

complejos unidos se recuperaron mediante PCR con iniciadores de flanqueo como se describió anteriormente. El producto de PCR se purificó sobre un eGel y se usó para el siguiente ciclo de selección. Después de la décima selección, el producto recuperado fue cortado con las enzimas Sall y NotI, y
5 clonado en el pDOM13 cortado de igual manera para expresión.

Las colecciones de tripletes se seleccionaron usando un método similar, salvo que se usaron 1×10^9 copias de ADN en la primera ronda de selección, y 5×10^8 después. Asimismo, el tiempo de incubación para la expresión de la proteína en emulsión fue reducido hasta 2 horas. El TGFbRII
10 FC biotinilado soluble se usó en las diez rondas de selección a 25, 10, 5, 5, 5, 5, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5 y 2.5 nM, respectivamente. El objetivo biotinilado se incubó con los complejos extraídos por 30 minutos. En las rondas de selección 5 a 10, el competidor TGFbRII-FC no biotinilado se añadió a una concentración final de 250 nM por 15, 30, 60, 60, 75 y 90 minutos,
15 respectivamente, antes de la adición de las DYNAbeads™ de estreptavidina C1. En la ronda 5, la competencia fue a temperatura ambiente, pero a partir de la ronda 6, la temperatura de la competencia se incrementó hasta 30 °C. El oligómero señuelo del operador Arc se incluyó en las rondas de selección 1 a 4 para reducir la complejación cruzada del ADN defectuoso.

20 Después de las selecciones, las inserciones que codifican para el dAb fueron separadas de los cassettes de expresión de exhibición de fagos usando Sall y NotI, y clonadas en el vector de expresión bacteriano pDOM13. Los dAbs fueron secuenciados y expresados en medio TB ONEX™, y los

sobrenadantes fueron tamizados mediante BIACORE™ para identificar los clones con constantes de velocidad de disociación mejoradas, en comparación con el precursor. Los clones con constantes de velocidad de disociación mejoradas fueron expresados y purificados, y se evaluaron para afinidad mediante BIACORE™ y potencia en la prueba del sensor de células. No se buscaron clones que dieran perfiles de cinética deficientes, contuvieran motivos de secuencia desfavorables, o dieran muy bajos rendimientos. Tres se seleccionaron por ser de más interés. Los clones DOM23h-271-21 (SEQ ID NO: 29) y DOM23h-271-22 (SEQ ID NO: 30) se aislaron de selecciones de colecciones mezcladas. El clon DOM23h-271-27 (SEQ ID NO: 31) se aisló de una selección de colección de tripletes. La afinidad de los clones seleccionados por el TGFbRII-FC de humano, se muestra en el cuadro 7.

CUADRO 7

	$K_a(M^{-1}.s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	KD (nM)
DOM23h-271-7*	5.37E+6	5.10E-2	9.49
DOM23h-271-21	3.21E+6	4.72E-4	0.147
DOM23h-271-22	3.22E+6	9.19E-4	0.286
DOM23h-271-27	2.17E+6	1.26E-3	0.578

* Los valores en el cuadro anterior, son sólo para propósitos de clasificación, puesto que el ajuste para DOM23h-271-7 al modelo de 1:1 fue deficiente, aunque las muestras maduras por afinidad se ajustaron bien a este modelo.

Exhibición de fagos

Colecciones mezcladas o de tripletes en los grupos de CDR1, CDR2 y CDR3 separados, se sometieron a rondas de selección de fagos como se describió anteriormente contra el antígeno del TGF- β RII/Fc biotinilado de humano durante 4 rondas en concentraciones de 10 nM, 1 nM, 100 pM y 20 pM, respectivamente, o dos rondas de selección usando antígeno 20 pM seguido de antígeno 2 pM. Las inserciones de las selecciones de fagos fueron clonadas en el vector de expresión pDOM10, y los sobrenadantes con constantes de velocidad de disociación mejoradas sobre el precursor, se seleccionaron para más estudio. Los anticuerpos de dominio fueron expresados y purificados, y se puso a prueba su afinidad y bioactividad contra el antígeno del TGF- β RII/Fc de humano en el BIACORE™ T100 y en la prueba del sensor de células descrito anteriormente (datos no mostrados). La afinidad de los clones seleccionados por el TGF β RII-FC de humano, se muestra en el cuadro 8.

CUADRO 8

	Muestra	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (M)
	271-101	3.73E+06	0.02014	5.40E-09
5	271-102	9.35E+06	0.01531	1.64E-09
	271-105a*	3.29E+06	0.00747	2.27E-09
	271-105b*	3.07E+06	0.007977	2.60E-09
	271-106a*	7.39E+06	0.02333	3.16E-09
	271-106b*	6.77E+06	0.01947	2.88E-09
10	271-114	1.04E+07	0.07084	6.80E-09
	271-7a*	3.04E+06	0.04193	1.38E-08
	271-7b*	2.42E+06	0.04448	1.84E-08

* La designación “a” y “b” se refiere a sobrenadantes separados que resultan de diferentes colonias de los clones enumerados.

15

Se determinó la secuencia de los clones seleccionados con actividad mejorada, y se muestran a continuación las secuencias completas y las secuencias de la CDR.

20

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-21 (SEQ ID NO: 29)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
IEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPG
RKWTAKFRWDYWGQGTLVIVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-21 (SEQ ID NO:

67)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACCGAGTATAG
5 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
AGATGCCGGGGCCGGAAGTGGACGGCCAAGTTCCGCTGGGACTACTGGG
10 GTCAGGGAACCCTGGTCATCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-22 (SEQ ID NO: 30)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
IEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPG
15 QKWMAKSRFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-22 (SEQ ID NO:

68)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
20 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG

GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
AGATGCCCCGGCCAGAAGTGGATGGCCAAGTCCCGCTTCGACTACTGGGG
TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

5

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-27 (SEQ ID NO: 31)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
IEPIGQKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGR
KWTANSRFDYWGQGLVIVSS

10

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-27 (SEQ ID NO:
69)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
15 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTCAGAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
CAGATTCCGGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGG
20 GTCAGGGAACCCTGGTCATCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-101 (SEQ ID NO:

32)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
IEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGR

5 KWTANGRKDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-101 (SEQ ID NO:

70)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
10 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
15 AGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATGGTCGTAAGGACTACTGGGG
TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-102 (SEQ ID NO:

33)

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
AIEPIGHRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPG
RKWTANSRFDYWQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-102 (SEQ ID NO:

71)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
5 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGGTTCAACATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
CAGATTCCGGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGG
10 GTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-105 (SEQ ID NO:

34)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
15 IEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGQ
RWTGNSRFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-105 (SEQ ID NO:

72)

20 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC

AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
 GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
 AGATTCCGGGGCAGCGGTGGACTGGTAATTCGCGGTTTGACTIONGGGG
 5 TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-106 (SEQ ID NO:
 35)

EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
 10 IEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQFPG
 RKWTANSRSDYWGGTLTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-106 (SEQ ID NO:
 73)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
 AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
 GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
 20 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
 AGTTTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTCTGACTIONGGGG
 TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-114 (SEQ ID NO:

36)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
IEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGR

5 KGTANSRFDYWGGGTLVTSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-114 (SEQ ID NO:

74)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
10 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
15 AGATTCCGGGGCGTAAGGGAACTGCTAATTCGCGGTTTGACTACTGGGG
TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

CUADRO 9

Secuencias de la CDR de 271 clones madurados por afinidad con actividad mejorada

		CDR1 (Kabat 26-35)	CDR2 (Kabat 50-65)	CDR3 (Kabat 95-102)
5	DOM23h-271-21	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO: 105)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 141)	QMPGRKWTAKFRWDY (SEQ ID NO: 177)
	DOM23h-271-22	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO: 106)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 142)	QMPGQKWMASRFDY (SEQ ID NO: 178)
	DOM23h-271-27	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO: 107)	AIEPIGQKTYADSVKG (SEQ ID NO: 143)	QIPGRKWTANSRFDY (SEQ ID NO: 179)
	DOM23h-271-101	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO: 108)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 144)	QIPGRKWTANGRKDY (SEQ ID NO: 180)
	DOM23h-271-102	GSTFTEYRMW (SEQ ID NO: 109)	AIEPIGHRTYADSVKG (SEQ ID NO: 145)	QIPGRKWTANSRFDY (SEQ ID NO: 181)
10	DOM23h-271-105	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO: 110)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 146)	QIPGQRWTGNSRFDY (SEQ ID NO: 182)
	DOM23h-271-106	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO: 111)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 147)	QFPGRKWTANSRSDY (SEQ ID NO: 183)
	DOM23h-271-114	GFTFTEYRMW (SEQ ID NO: 112)	AIEPIGNRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 148)	QIPGRKGTANSRFDY (SEQ ID NO: 184)

Las CDR2 y CDR3 son como son definidas por Kabat. La CDR1 se define mediante una combinación de los métodos de Kabat y Chothia.

15 **Método genérico para la cinética de unión – T100**

Se llevó a cabo análisis BIACORE™ usando una superficie de captura sobre un chip CM4. Se usó IgG anti-humano como el agente de captura, y fue acoplada a un chip biosensor CM4 mediante acoplamiento de amina primaria. La molécula de antígeno fusionada con el Fc de humano fue
20 capturada sobre esta superficie inmovilizada hasta un nivel de 250 a 300 unidades de resonancia, y concentraciones definidas de los anticuerpos de dominio diluidos en regulador de pH de la corrida se hicieron pasar sobre esta superficie de captura. Una inyección de regulador de pH sobre la superficie

capturada del antígeno se usó como doble referencia. Se regeneró la superficie capturada, después de cada inyección del anticuerpo de dominio usando una solución de cloruro de magnesio 3 M; la regeneración removió el antígeno capturado, pero no afectó significativamente la capacidad de la superficie para capturar el antígeno en un ciclo subsiguiente. Todas las corridas se llevaron a cabo a 25 °C usando regulador de pH de HBS-EP como regulador de pH de la corrida. Los datos se generaron usando el BIACORE™ T100 y se ajustaron al modelo de unión 1:1 inherente al software. Cuando se observó unión no específica a la concentración superior, la curva de unión a esta concentración se removió de la serie de análisis.

Más diversificación de la CDR3

Los derivados de DOM23h-271-7 con la más alta afinidad contenían metioninas en las posiciones 96 y 100B. Estas posiciones, junto con las posiciones 99, 100D, 100E y 100G, fueron diversificadas usando mutagénesis de NNK para determinar si las sustituciones podrían hacerse. La colección de NNK se construyó como se describió anteriormente usando el iniciador PEP-26-F que introduce diversidad en las posiciones seleccionadas en el ambiente de DOM23h-271-22 o DOM23h-271-102. DOM23h-271-102 contiene mutaciones en las posiciones 27 y 55 que confieren afinidad mejorada sobre DOM23h-271-7.

PEP-26-F (SEQ ID NO: 209)

GCGGTATATTACTGTGCGAAACAGNNSCCCGGCNSAAGTGGNNSGCCN
 NSNNSCGCNSGACTACTGGGGTCAGGGAACC

5 Se construyeron colecciones de exhibición de ADN y se
 seleccionaron sobre hTGFbRII-FC biotinilado como se describió anteriormente
 usando concentraciones de 5 nM; 0.5 nM; 0.1 nM; 0.1 nM; 0.1 nM; y 0.1 nM
 en rondas sucesivas. En las rondas de selección 4 a 6, el competidor
 TGFbRII-FC no biotinilado se añadió a una concentración final de 100 nM por
 10 60, 90 y 90 minutos, respectivamente, antes de la adición de DYNAb beads™
 de estreptavidina C1. Después de la selección, las inserciones del dAb fueron
 amplificadas por PCR usando los iniciadores PelB NcoVh y PEP011, cortadas
 con NcoI y EcoRI, y clonadas en el vector de expresión bacteriano pC10.

15 PelB NcoVh (SEQ ID NO: 210)

GCCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGG

PEP011 (SEQ ID NO: 211)

GAATTCGCGGCCGCCTATTAGCTCGAGACGGTGACCAGGG

20 Los productos clonados fueron expresados y tamizados
 mediante Biacore. Los clones con constantes de velocidad de disociación
 similares o mejores que DOM23h-271-22 fueron secuenciados, purificados y

puestos a prueba para afinidad mediante BIACORE™ y potencia en la prueba del sensor de células. No se buscaron clones que dieran perfiles de cinética deficientes, contuvieran motivos de secuencia desfavorables, o dieran rendimientos muy bajos. Se seleccionó a DOM23h-271-50 para más
5 maduración por afinidad.

Secuencia de ácido nucleico de DOM-271-50 (SEQ ID NO: 212)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
10 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
CAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGCTCGCCCGGGGCGCTTGGACTACTGG
15 GGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
```

Secuencia de aminoácidos de DOM-271-50 (SEQ ID NO: 213 y
entrada del duplicado SEQ ID NO: 214)

```
EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
20 AIEPIGHRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAP
GEKWLARGRLDYWGQGTLVTVSS
```

EJEMPLO 7

Introducción de mutaciones en las secuencias del dAb del TGFbRII

(linaje de DOM23h-271) en las posiciones 61 y 64

5 Las mutaciones dobles D61N y K64R se han introducido previamente en varios linajes del dAb del TGFbRII, y se ha mostrado que mejoran la potencia (véase el documento WO2011/012609). Estas mutaciones fueron introducidas en los linajes de DOM23h-271 del dAb del TGFbRII para ver si podría lograrse una mejora similar en potencia. Se exploraron
10 mutaciones alternativas en esta posición para determinar si podrían lograrse más mejoras en potencia.

Se introdujeron las mutaciones en la estructura de base de DOM23h-271 (SEQ ID NO: 199) mediante extensión por traslape usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Ho, *et al.*, Gene 1989 77(1)); se
15 usaron oligonucleótidos iniciadores complementarios para generar dos fragmentos de ADN que tuvieran extremos traslapantes o complementarios. Estos fragmentos se combinaron en una PCR de ensamble subsiguiente en la cual los extremos traslapantes se unen, permitiendo que el traslape 3' de cada cadena sirva como un iniciador para la extensión 3' de la cadena
20 complementaria, y el producto de fusión resultante sea amplificado adicionalmente mediante PCR. Se introdujeron alteraciones específicas en la secuencia de nucleótidos incorporando cambios de nucleótido en los oligonucleótidos iniciadores traslapantes. Los fragmentos objetivo del gen del

dAb fueron amplificados mediante dos PCRs separadas usando la polimerasa SUPERTAQ™ (HT Biotechnology). Se seleccionó a DOM23h-271, ya que tiene una baja afinidad por el TGFbRII, de modo que las mejoras en la afinidad fueran claramente mensurables usando BIACORE™. Las mutaciones

5 en las posiciones 61 y 64 fueron codificadas usando un oligonucleótido degenerado que muta ambas posiciones en combinación, con la intención del uso de la selección por afinidad para enriquecer los mutantes con afinidad de unión mejorada. Puesto que se sabe que la mutación NR domina esta mutación, se evitó en la colección usando un codón restringido, NNG, en la

10 posición 61. Este codón codifica para 13 aminoácidos, pero no incluye los aminoácidos F, Y, C, H, I, N o D. La Cys libre no fue favorecida dentro de un dAb, y la asparagina tampoco se deseó en esta posición, de modo que sólo se excluyeron 5 combinaciones de aminoácido deseables. En la posición 64, se usó un codón de NNK para proveer la escala completa de aminoácidos

15 posibles.

Los pares de oligonucleótidos usados para introducir las mutaciones fueron PE008 (flanquea el inicio 5' del gen del dAb: 5'-TTGCAGGCGTGGCAACAGCGTCGACAGAGGTGCAGCTGTTGGAG-3')

(SEQ ID NO: 192) con 271-6164 R (5'-GCGTAGTATGTACGATTACCAATCGG-3') (SEQ ID NO: 193) y 271-6164

20 deg-F mutado (residuos mutados subrayados: 5'-GGTAATCGTACATACTACGCANNGTCCGTGNNKGGCCGGTTCACCATCTCCGC-3') (SEQ ID NO: 194) con AS1309 (flanquea el extremo 3' del gen del

dAb:

5'-

TGTGTGTGTGTGGCGGCCGCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGA

CCCCA-3') (SEQ ID NO: 195). Los dos fragmentos de PCR fueron

recombinados en una PCR de ensamble usando la ADN polimerasa

5 SUPERTAQ™ sin la adición de iniciadores. El producto de fusión se amplificó

entonces mediante la adición de los iniciadores de flanqueo PE008 y AS1309

a la reacción de PCR. El dAb mutado fue digerido con las endonucleasas de

restricción Sal I y Not I, ligado en el vector de expresión pDOM13 cortado de

igual manera, y transformado en células HB2151 de *E. coli*. La mutación

10 D61N, K64R se introdujo también en DOM23h-271 de la misma manera, pero

sustituyendo con el iniciador 271-6164 NR-F (5'-

GGTAATCGTACATACTACGCAAACCTCCGTGCGCGGCCGGTTCACCATCTC

CCGC-3') (SEQ ID NO: 196) a 271-6164 deg-F. Los dAbs mutados se

identificaron mediante secuenciación. Se identificaron 129 clones con

15 combinaciones novedosas de mutaciones en la posición 61 y 64, aunque 11

tenían mutaciones adicionales debido a los errores de la PCR. Estos se

muestran en el cuadro 11. Los clones con afinidad mejorada están

subrayados. Los clones con mutaciones adicionales se indican mediante

asteriscos.

20 Para determinar el efecto de las mutaciones, los clones

seleccionados fueron expresados en TB ONEX™ en placas de 96 cavidades

por 72 horas a 30 °C o 24 horas a 37 °C. Los sobrenadantes fueron clarificados

mediante centrifugación y filtrados a través de un filtro de 0.22 µm antes de la

evaluación de la constante de velocidad de disociación mediante BIACORE™.

Se llevó a cabo análisis BIACORE™ A100 usando una superficie de captura sobre un chip CM5. Se usó IgG anti-humano como el agente de captura, y fue acoplada a un chip biosensor CM5 mediante acoplamiento de amina primaria. La molécula de antígeno fusionada con el Fc de humano fue capturada sobre esta superficie inmovilizada hasta un nivel de 200 a 300 unidades de resonancia, y los sobrenadantes o los anticuerpos de dominio purificados se hicieron pasar sobre esta superficie capturada. Una inyección de medio o regulador de pH sobre la superficie capturada del antígeno se usó como doble referencia. En cada celda de flujo, una mancha de proteína A permitió confirmar la presencia del anticuerpo de dominio en cada muestra inyectada. Se regeneraron las superficies, después de cada inyección del anticuerpo de dominio usando una solución de cloruro de magnesio 3 M; la regeneración removió el antígeno capturado, pero no afectó significativamente la capacidad de la superficie para capturar el antígeno en un ciclo subsiguiente. Todas las corridas se llevaron a cabo a 25°C usando regulador de pH de HBS-EP como regulador de pH de la corrida. Los datos se generaron usando el BIACORE™ T100 y se analizaron usando su software inherente. La cinética de las muestras purificadas se ajustó al modelo de unión 1:1 mientras las constantes de velocidad de disociación del sobrenadante se analizaron usando el modelo de disociación 1:1 y/o usando el nivel de unión y el nivel de estabilidad de cada muestra en comparación con la molécula precursora.

De los clones puestos a prueba, se identificaron 46 con constante de velocidad de disociación mejorada en comparación con el dAb de DOM23h-271 precursor, como se indica en el cuadro 11. Se encontró que las mutaciones D61R y D61K aumentan la unión independientemente de las mutaciones en la posición 64. Muchas combinaciones parecieron ser mejores
5 que las mutaciones D61N, K64R originales, y éstas incluyeron RE, RM, RF y RY.

Una selección de mutantes con constante de velocidad de disociación mejorada se purificó y se sometió a análisis de cinética
10 BIACORE™ A100 completo, para determinar su afinidad (cuadro 10). La estabilidad térmica de los mutantes se determinó también mediante la generación de perfiles de fusión en presencia de SYPRO™ Orange (Invitrogen). En resumen, los dAbs purificados fueron diluidos hasta 50 y 100 µg/ml en una dilución 1:500 de SYPRO™ Orange en PBS, y se sometieron a
15 una curva de fusión de 30 a 90 °C en una máquina de PCR Mini OPTICON™ (BioRad). La T_m de la transición positiva mayor se determinó en cada concentración y se usó para calcular un valor de T_m estimado a 1 mg/ml como una indicación de la temperatura de fusión por comparación (cuadro 10).

Se seleccionaron las mutaciones D61R, K64D y D61R, K64F, ya
20 que tenían una buena mejora en afinidad por un impacto reducido en la T_m. Estas mutaciones se transfirieron a un derivado de DOM23h-271 madurado por afinidad, DOM23h-271-22 (SEQ ID NO: 30), para obtener los dAbs DOM23h-271-39 (SEQ ID NO: 37) y DOM23h-271-40 (SEQ ID NO: 38). Se

encontró que estas mutaciones dan una mejora en afinidad mediante BIACORE™ que incluye reactividad cruzada con el TGFbRIIFc de murino, y potencia mejorada mediante la prueba del sensor de células. Sin embargo, se encontró también que las mutaciones reducen la Tm medida mediante la

5 DSC, e incrementan la agregación de los dAbs en PBS, según se mide mediante SEC MALLS. Estas pruebas se llevaron a cabo como se describió anteriormente, salvo que el regulador de pH para SEC MALLS fue NaCl 0.4 M, fosfato de sodio 0.1 M e isopropanol a 10%, pH 7. Estos resultados se resumen en el cuadro 12 (se dan los valores promedio para la prueba del

10 sensor de células humanas y la prueba de luciferasa 3T3 de ratón).

Se dan a continuación las secuencias de los dAbs referidos en este ejemplo:

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-39 (SEQ ID NO: 37)

15 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
IEPIGNRTYYARSVDGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPG
QKWMAKSRFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-39 (SEQ ID NO:

20 75)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG

GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCACGCTCCGTGGAC
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
5 CAGATGCCCCGGCCAGAAGTGGATGGCCAAGTCCCGCTTCGACTACTGGG
GTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-40 (SEQ ID NO: 38)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSA
10 IEPIGNRTYYARSVFGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPG
QKWMAKSRFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-40 (SEQ ID NO:

76)
15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACGGAGTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCACGCTCCGTGTTG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
20 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
AGATGCCCCGGCCAGAAGTGGATGGCCAAGTCCCGCTTCGACTACTGGGG
TCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

CUADRO 10

Descripción	Mutación	Tm estimado 1 mg/ml	KD (nM)
1A2	RA	53.08	2.24
1D9	RD	52.35	1.17
3F11	RE	53.08	3.27
1G11	RM	51.81	0.97
3C9	RF	54.08	1.39
1E6	RY	49.62	1.17
1B11	RV	53.41	1.88
3D9	KG	48.69	4.34
1D5	KF	48.09	3.69
3D4	KT	54.74	4.26
1H11	LW	53.68	4.17
1B2	VW	52.68	1.79
2C12	NR	51.49	3.34
271	DK	58.21	N/D

La mutación corresponde a “XY”, en donde X es la posición 61 y Y es la posición 64.

CUADRO 11**Mutaciones insertadas en DOM23h-271 en las posiciones 61 y 64**

61\64	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A		<u>1D6*</u>									1C10	<u>3B11</u>		<u>3C10*</u>		<u>3B10</u>		1A12		<u>3G3*</u>
R	<u>1A2</u>	<u>1A3</u>	<u>3F4</u>	<u>1D9</u>	<u>2C4</u>	<u>1A8</u>	<u>3F11</u>	<u>3G8</u>		<u>1A4</u>		<u>3C2</u>	<u>1G11</u>	<u>3C9*</u>		<u>2F5</u>	<u>1H1</u>	<u>1H2</u>	<u>1E6</u>	<u>1B11</u>
N		<u>2C12</u>																		
D												3H6 (wt)								
C																				
Q	1B6*	<u>1E8</u>						<u>1B10</u>		1H12	1D11						1C8	<u>3F7</u>	2C10	
E		2A3			<u>1F12</u>			2G4			3H7				1F10	2B11	3D6			
G	1D1	1B5				3B12		<u>1E5</u>			3G11	3D12				2B6	2G5	2D5		
H																				
I																				
L	1D2	3E11	2A9			1B4	1H3	1A9		1F1	1G9	1H10	1C9	2C9	1H5	1G2	1E4	1H11		
K		<u>2E5</u>					<u>2B4</u>	<u>3D9</u>				<u>3E12</u>		<u>1D5</u>	<u>1G7</u>	<u>2E9*</u>	<u>3D4</u>		<u>1B1</u>	<u>1F2</u>
M						1G6		<u>2D3*</u>			1E7	2E6	3C12	2F6	<u>3H1</u>	3B5*	1A6		1E11	<u>3B8*</u>
F																				
P			2A8				1A5	2C11						3H2		1G5			3G12	
S		<u>3C3</u>		3E7				3E5		1H4		2B10	1C11	1B7	2C8	3B1		<u>3D5</u>		
T		1E3	1D10*			2C1		1C1		2A5	3G9			2H10			2A4		3D11	
W	2F10	1E12				2C2		2A2			2A6		1D4		3B2		2B1			
Y																				
V		1C12			<u>2B9</u>	1H6	1D3*	3C1		2G2	2F7	1F7			<u>2H4</u>	3C7		<u>1B2</u>		2G6

Los clones con constante de velocidad de disociación mejorada, están subrayados. Los clones con mutaciones adicionales se indican mediante asteriscos.

CUADRO 12

	Mutación	Sensor de células humanas	Prueba de luciferasa en células 3T3 de ratón	TGFbRII de humano	TGFbRII de Cynomolgus	TGRbRII de ratón	Tm (DSC)	Agregación (SEC-MALLS)
		IC50 (nM)	IC50 (nM)	KD (pM)	KD (pM)	KD (pM)		
DOM23h-271-22	-	39.01	>17780	202.00	225.00	-	60	91.8% de monómero 8.2% de dímero
DOM23h-271-39	RD	1.17	11120	14.90	24.00	1780.00	57.5	51.6% eq. de M/D 38.5% eq. de D/T + agregados
DOM23h-271-40	RF	0.53	1200	9.99	11.25	548.50	55.6	91.6% eq. de M/D 8.4% de trímero/oligómero

EJEMPLO 8**Maduración por afinidad mediante la diversificación de la CDR de los linajes DOM23h-439-20, DOM23h-843-13, DOM23h-855-21 y DOM23h-271-****50**

5

Se aislaron los anticuerpos de dominio DOM23h-855-21 (SEQ ID NO: 204) y DOM23h-843-13 (SEQ ID NO: 206) de la maduración por afinidad propensa a error llevada a cabo en los clones sin afectación DOM23h-855 (SEQ ID NO: 13) y DOM23h-843 (SEQ ID NO: 10), respectivamente, como se

10 detalla en el ejemplo 5. El anticuerpo de dominio DOM23h-439 se aisló de colecciones de fagos en una campaña de selección previa descrita en el documento WO 2011/012609 y el DOM23h-439-20 variante (SEQ ID NO: 208) se aisló posteriormente mediante maduración por afinidad propensa a error como se detalla en el ejemplo 5. Se generó el anticuerpo de dominio

15 DOM23h-271-50 (SEQ ID NO: 214) mediante re-diversificación de la CDR3 de la variante madurada por afinidad dirigida por la CDR DOM23h-271-22 (SEQ ID NO: 30) como se detalla en el ejemplo 6. Se seleccionaron DOM23h-855-21, DOM23h-843-13, DOM23h-439-20 y DOM23h-271-50 para más maduración por afinidad con base en su cinética de unión, potencia en la

20 prueba del sensor de células HEK 293T SBE-bla, secuencia y comportamiento biofísico. Se llevó a cabo maduración por afinidad usando mutagénesis degenerada para re-diversificar las CDRs, y las secuencias guía mejoradas se identificaron usando exhibición de fagos. Se introdujo diversidad en las CDRs

mediante la construcción de colecciones mezcladas o de NNK.

DOM23h-271-50 fue madurado por afinidad usando colecciones de NNK (mutagénesis por saturación). Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para cubrir cada CDR, y dentro de cada iniciador, los codones para 5 aminoácidos fueron reemplazados con codones de NNK, de modo que 5 posiciones sean diversificadas simultáneamente. Se usaron oligonucleótidos individuales o múltiples para cubrir todos los aminoácidos elegidos como objetivo dentro de cada CDR; 1 para la CDR1, 2 para la CDR2 y 3 para la CDR3. Se logró la maduración por afinidad dirigida por la CDR usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR); se usaron oligonucleótidos iniciadores complementarios para amplificar un fragmento de secuencia que contenía cada CDR mutada, y también un fragmento de secuencia traslapante que cubre el resto de la secuencia que codifica para el dAb. Estos fragmentos se mezclaron y se ensamblaron mediante PCR traslapante de extensión por empalme para producir la secuencia codificante del dAb de longitud completa. Este producto fue amplificado por PCR usando los iniciadores PelB NcoVh (SEQ ID NO: 210) y PEP044 (5'-GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGGCCGCATAATAAGAATTCA-3' SEQ ID NO: 215), digerido con NcoI y NotI, y ligado en el vector híbrido pDOM4-gene3-pelB digerido con NotI y NcoI. El vector híbrido pDOM4-gene3-pelB es una versión modificada del vector pDOM4 descrito anteriormente, pero ha sido modificado para reemplazar la secuencia guía GAS con el péptido de señal pelB (pectato liasa B).

Los anticuerpos de dominio DOM23h-855-21, DOM23h-843-13 y DOM23h-439-20 fueron madurados por afinidad usando colecciones mezcladas. Las colecciones mezcladas se construyeron esencialmente como se describió anteriormente y en el documento WO2006018650. Un oligonucleótido iniciador degenerado individual se usó para cubrir todas las mutaciones dentro de cada CDR. Dentro de cada iniciador, los aminoácidos por ser diversificados se especificaron usando codones degenerados que codifican para aminoácidos múltiples. Se usó la siguiente codificación degenerada: 'a' = 85% de A + 5% de T + 5% de G + 5% de C; 'g' = 85% de G + 5% de T + 5% de C + 5% de A; 'c' = 85% de C + 5% de T + 5% de G + 5% de A; 't' = 85% de T + 5% de A + 5% de G + 5% de C; 'S' = 50% de G y 50% de C. Las letras mayúsculas indican 100% del nucleótido especificado. Para la colección impurificada de DOM23h-439-20, los cinco aminoácidos fueron diversificados en la CDR1, 6 en la CDR2 y 11 en la CDR3 para incluir la fenilalanina en la posición 100. Para la colección impurificada de DOM23h-855-21 los cinco aminoácidos fueron diversificados en la CDR1, 7 en la CDR2 y 8 en la CDR3. Para la colección impurificada de DOM23h-843-13, cinco aminoácidos fueron diversificados en la CDR1, 6 en la CDR2 y 8 en la CDR3, posición 94, antes de que la CDR3 fuese diversificada también introduciendo el codón VRK. Para cada uno de los dAbs, se construyeron 4 colecciones mezcladas, una para diversificar la CDR1, una para diversificar la CDR2, una para diversificar la CDR3, y una cuarta en donde todas las CDRs fueron diversificadas. Los iniciadores degenerados de la colección se usaron de la

misma manera como los iniciadores de tripletes. Cada CDR diversificada fue amplificada por separado y combinada entonces con un fragmento de secuencia precursor usando traslape de extensión por empalme, y el producto de longitud completa fue amplificado usando los iniciadores PelB NcoVh (SEQ ID NO: 210) y DOM173 (SEQ ID NO: 188). Los fragmentos fueron subclonados con el vector híbrido pDOM4-gene3-pelB usando NcoI y NotI.

Secuencias del iniciador degenerado:

10 23h-439-20 CDRH1 (SEQ ID NO: 216)

5'-

GCAGCCTCCGGATTACCTTTggSacSgagcagATGtggTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGG-3'

15 23h-439-20 CDRH2 (SEQ ID NO: 217)

5'-

AAGGGTCTAGAGTTTGTCTCAcgSATTgattcScsSGGTggScgSACATACTAC
GCAGACTCCGTG-3'

20

23h-439-20 CDRH3 (SEQ ID NO: 218)

5'-

GCGGTATATTACTGTGCGAAAcgScatgcSgcSggSgtStcSggSacStaYtttGACT
ACTGGGGTCAGGGAACC-3'

5

23h-843-13 CDRH1 (SEQ ID NO: 219)

5'-

GCAGCCTCCGGATTACCTTTgatcaggatcgSATGtggTGGGTCCGCCAGGC
CCCAGGG-3'

10

23h-843-13 CDRH2 (SEQ ID NO: 220)

5'-

AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAgcSATTgagtcSggSGGTcatcgSACATACTAC
GCAGACTCCGTG-3'

15

23h-843-13 CDRH3 (SEQ ID NO: 221)

5'-

ACCGCGGTATATTACTGTGCGVRKcagaataagtcSggScgStcSggSTTTGACTA
CTGGGGTCAGGGA-3'

20

23h-855-21 CDRH1 (SEQ ID NO: 222)

5'-

GCAGCCTCCGGATTACCTTTgagaatacStcSATGggSTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGG-3'

5

23h-855-21 CDRH2 (SEQ ID NO: 223)

5'-

AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAcgSATTgatccSaagGGTtcScatACATACTACa
cS GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC-3'

10

23h-855-21 CDRH3 (SEQ ID NO: 224)

5'-

GCGGTATATTACTGTGCGAAAcagcgSgagctSggSaagtcStaYTTTGACTACTG
GGGTCAGGGA-3'

15

H1-271-43 R (SEQ ID NO: 225)

5'-

GCAGCCTCCGGATTACCTTTNNKNNKNNKNNKATGNNKTGGGTCCGCC
AGGCTCCGGGGAAGGGTCTC-3'

20

H2p1-271-43F (SEQ ID NO: 226)

5'-

CCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCANNKATTNNKNNK
NNKGGTNNKCGTACATACTACGCAGACTCCG-3'

5

H2p2-271-43 F (SEQ ID NO: 227)

5'-

CCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCAGCGATTGAGNN
KNNKNNKNNKNNKACATACTACGCAGACTCCG-3'

10

H3p1-271-43 F (SEQ ID NO: 228)

5'-

ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAANNKNNKNNKNNKNNKAAGTGGATGG
CCGTGGGCCGCTTGGACTIONTGGGGTCAGGG-3'

15

H3p2-271-43 F (SEQ ID NO: 229)

5'-

ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGAAGCCCNNKNNKNNKNNKNNKG
CCGTGGGCCGCTTGGACTIONTGGGGTCAGGG-3'

20

H3p3-271-43 F (SEQ ID NO: 230)

5'-

ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGAAGCCCCGGCCAGAAGTGGNNKN
NKNNKNNKNNKTTGGACTACTGGGGTCAGGG-3'

5

Exhibición de fagos:

Las colecciones de NNK o mezcladas en los grupos de la CDR1, CDR2 y CDR3 separados y la CDR1, 2 y 3 combinados, se sometieron a por lo menos 6 rondas de selección contra el antígeno del TGF- β RII 100 nM, 10 nM, 1 nM, 1 nM, 0.1 nM y 0.1 nM monomérico biotinilado de humano (rondas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente) como se describió en el ejemplo 1, con la siguiente desviación hacia el paso de bloqueo; el fragmento Fc de IgG humana que se añadió previamente en el ejemplo 1 se omitió, y se realizó el paso de bloqueo por un mínimo de 20 minutos. En las rondas 4 y 6 de selección, se introdujo competencia mediante incubación con el antígeno no biotinilado 100 nM por 30 minutos (rondas 4 y 6) después del paso de incubación con el antígeno marcado. Para DOM 23h-439-20 (CDR1, CDR3 y grupos combinados) y DOM 23h-855-21 (CDR3), se llevó a cabo una séptima ronda de selección contra el antígeno del TGF- β RII 0.1 nM monomérico de humano y competencia a 100 nM por 120 minutos, o el antígeno del TGF- β RII 20 pM monomérico biotinilado de humano con competencia a 100 nM por 30 minutos. El fago fue amplificado entre las rondas de selección mediante la centrifugación de un cultivo la noche anterior de células TG1 infectadas con el

fago por 30 minutos a 4000 g. Se añadieron 40 ml del sobrenadante que contenía al fago amplificado a 10 ml de PEG/NaCl (PEG 8000 a 20% en v/p + NaCl 2.5 M), y se incubaron sobre hielo por 60 minutos. Las muestras se centrifugaron por 40 minutos a 4000 g para convertir a pellas el fago precipitado. El sobrenadante se desechó, y la pella de fagos se resuspendió en 1 ml de glicerol a 15% en v/v/PBS. La muestra de fagos se transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml y se centrifugó por 10 minutos para remover cualquier resto de células bacterianas restante. Los genes del Vh del anticuerpo de dominio diversificados de las selecciones de fagos fueron amplificados por PCR usando los iniciadores PEP011VHStopNotIR (5'-CCCTGGTCACCGTCTCGAGCTAATAGGCGGCCGCGAATTC-3' (SEQ ID NO: 231) y Nco1 VH F (5'-TATCGTCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 232), digeridos con las endonucleasas de restricción NcoI y NotI, y ligados en el vector pC10 también digerido con NcoI y NotI. pC10 es un vector de plásmido basado en el vector pUC119, con expresión bajo el control de un promotor LacZ mejorado diseñado para la expresión de los dAbs solubles. La expresión de los dAbs en el sobrenadante es permitida por la fusión del gen de los dAbs con el péptido de señal pEIB en el extremo N-terminal. Los productos de ligación fueron transformados en células HB2151 de *E. coli* químicamente competentes y sembrados en placas de agar nutritivo complementado con 100 µg/ml de carbenicilina. Los clones individuales fueron seleccionados y expresados en medio de autoinducción rápida la noche

anterior (sistema de expresión de proteínas de alto nivel, Novagen), complementados con 100 µg/ml de carbenicilina en placas de 96 cavidades, y cultivados con agitación a 250 rpm por 66 horas a 30°C o 24 horas a 37°C. Las placas de expresión se centrifugaron entonces a 3500 g por 15 minutos, y

5 los sobrenadantes se filtraron usando placas de filtración de 0.45 µ (Millipore). Los sobrenadantes que contenían a los anticuerpos de dominio se tamizaron en el BIACORE™ B4000 contra el TGF-β RII de humano y el TGF-β RII/Fc de humano, para determinar la constante de velocidad de disociación (Kd) (datos no mostrados). Los antígenos biotinilados fueron capturados sobre un chip de

10 SA de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se llevó a cabo el análisis a 25°C usando regulador de pH de HBS-EP. Las muestras se hicieron correr en el BIACORE™ a una magnitud de flujo de 30 µl/min. Se logró la regeneración del chip usando glicina a bajo pH. Los datos (no mostrados) se analizaron para constante de velocidad de disociación mediante el ajuste de la

15 fase de disociación al modelo de disociación 1:1 inherente al software, y los sobrenadantes se analizaron también para unión a proteína A para estimar los niveles de expresión. Los anticuerpos de dominio con constantes de velocidad de disociación mejoradas sobre el precursor, se seleccionaron para más estudio. Los clones mejorados fueron expresados en medio de autoinducción

20 rápida la noche anterior (ONEX™, Novagen) complementado con 100 µg/ml de carbenicilina y antiespumante (Sigma) a 30°C por 48 a 72 horas con agitación a 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron (4,200 rpm por 40 minutos) y los sobrenadantes se incubaron con perlas de STREAMLINE™-proteína A

(Amersham Biosciences, GE HEALTHCARE™, Reino Unido. Capacidad de unión: 5 mg del dAb por ml de perlas), a 4°C o a temperatura ambiente por cuando menos una hora. Las perlas se empacaron en una columna de cromatografía y se lavaron con PBS, seguido de Tris-HCl 10 mM pH 7.4
5 (Sigma, reino Unido). Los dAbs unidos fueron eluidos con glicina-HCl 0.1 M, pH 2.0, y neutralizados con Tris-HCl 1 M, pH 8.0. La DO a 280 nm de los dAbs se midió, y se determinaron las concentraciones de proteína usando los coeficientes de extinción calculados a partir de las composiciones de aminoácidos de los dAbs. Los anticuerpos de dominio madurados por afinidad
10 se pusieron a prueba en el BIACORE™ T200 (los datos para dos dAbs preferidos se muestran en el ejemplo 9) y en la prueba del sensor de células HEK 293T SBE-bla (los datos para dos dAbs preferidos se muestran en el ejemplo 11) para determinar su afinidad y potencia. Propiedades biofísicas que incluyen la estabilidad térmica y el estado en solución, se determinaron
15 usando calorimetría de barrido diferencial (DSC) y cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser de ángulos múltiples (SEC-MALLS) (los datos para dos dAbs preferidos se muestran en el ejemplo 10).

Se muestran a continuación las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de los dAbs del TGFRII anti-humano DOM23h-439-20 y
20 DOM23h-271-50.

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-25 (SEQ ID NO:

233)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC
5  AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCTC
   ACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
   GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
   AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
   CGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAG
10  GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
```

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-25 (SEQ ID NO:

234)

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSR
15  IDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPT
   GVSGTFYDYWGQGTLVTVSS
```

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-123 (SEQ ID NO:

235)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
20  GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
```

AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
 GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 CAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGG
 5 GGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-123 (SEQ ID NO:
 236)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
 10 AIEPIGHRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAP
 GEKWARRWDLDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-35 (SEQ ID NO:
 237)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACCGATCA
 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCTCA
 CGCATTGATTCCCCCGGTGGGCGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGG
 GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
 20 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
 GGCAGCCGGCGGGGGTGTGCGGGGAAGTACGTTGACTACTGGGGTCAGG
 GAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-35 (SEQ ID NO:
238)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTDQMWWVRQAPGKGLEFVSR
IDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRQPA
5 GVSGKYVDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-129 (SEQ ID NO:
239)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
10 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
15 CAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGGCGCTTGGACTACTGGG
GTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-129 (SEQ ID NO:
240)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
AIEPIGHRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPN
QRYVARGRLDYWGQGTLVTVSS

Las CDRs, como es definido por Kabat, de estas secuencias guía de afinidad del dAb del TGF β RII anti-humano, se muestran en el cuadro 13.

5

CUADRO 13

Secuencias de la CDR de los dAbs del TGF β RII anti-humano madurados por afinidad

10

	CDR1 (Kabat 26-35)	CDR2 (Kabat 50-65)	CDR3 (Kabat 95-102)
DOM23h-271-123	GSTFTEYRMW (SEQ ID NO: 241)	AIEPIGHRITYYADSVKG (SEQ ID NO: 242)	QAPGEKWARRWDLDY (SEQ ID NO: 243)
DOM23h-271-129	GSTFTEYRMW (SEQ ID NO: 244)	AIEPIGHRITYYADSVKG (SEQ ID NO: 245)	QAPNQRYVARGRLDY (SEQ ID NO: 246)
DOM23h-439-25	GFTFGTEQMW (SEQ ID NO: 247)	RIDSPGGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 248)	RRPTGVSGTFYDY (SEQ ID NO: 249)
DOM23h-439-35	GFTFGTDQMW (SEQ ID NO: 250)	RIDSPGGRTYYANSVKG (SEQ ID NO: 251)	RQPAGVSGKYVDY (SEQ ID NO: 252)

15

Más modificación de la secuencia de nucleótidos de DOM23h-439-25 y DOM23h-271-123

Las mutaciones D61N y K64R como se describieron en el ejemplo 7, se introdujeron en los dAbs madurados por afinidad DOM23h-439-25, DOM23h-271-123 y DOM23h-271-129, ya sea en combinación o por separado. La introducción de una mutación V48I en los dAbs DOM23h-439-25 y DOM23h-271-123 se puso a prueba también para determinar si podrían conferir mejoras en potencia. Se observó mutación espontánea en la posición

48 de Kabat en muchos dAbs mejorados del linaje DOM23h-439 después de la prueba de maduración y la maduración por afinidad dirigida por la CDR. Una alanina en el extremo C-terminal de la región del Vh, inmediatamente después del residuo 113 de Kabat, se añadió también a DOM23h-439-25, 5 DOM23h-271-123 y DOM23h-271-129 y todas las variantes de estos dAbs con las mutaciones mencionadas anteriormente. Las mutaciones se introdujeron en las estructuras de base de DOM23h-439-25 (SEQ ID NO: 234), DOM23h-271-123 (SEQ ID NO: 236) y DOM23h-271-129 (SEQ ID NO: 240) mediante extensión por traslape usando la reacción en cadena de 10 polimerasa (PCR) esencialmente como se describió en el ejemplo 7. Se introdujeron mutaciones específicas en la secuencia de nucleótidos incorporando cambios de nucleótido en los oligonucleótidos iniciadores traslapantes, y la inserción de la alanina en el extremo de la región del Vh se logró usando un oligonucleótido 3' diseñado para incorporar el residuo de 15 alanina después de la posición 113 de Kabat.

Se usaron los siguientes oligonucleótidos para introducir las mutaciones (los residuos mutados están subrayados):

439 48I SDM F (SEQ ID NO: 253)

20 5'-GGGTCTAGAGTTTATTTCACGTATTGATTGCGC-3'

439 61N SDM F (SEQ ID NO: 254)

5'-GGGAGGACATACTACGCAAAACTCCGTGAAGGGCCGG-3'

439 64R SDM F (SEQ ID NO: 255)

5 5'-CGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

439 61N 64R SDM F (SEQ ID NO: 256)

5'-GGGAGGACATACTACGCAAAACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

10 271 61N SDM F (SEQ ID NO: 257)

5'-GGACATACTACGCAAAACTCCGTGAAGGGCCGG-3'

271 64R SDM F (SEQ ID NO: 258)

5'-CGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

15

271 61N 64R SDM F (SEQ ID NO: 259)

5'-GGACATACTACGCAAAACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

567 +A rev (flanquea el extremo 3' del gen del Vh del dAb) (SEQ ID NO: 260)

20 5'-CCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGTAATAAGCGGCCGCAGATTA-3'

21-23 Fwd (flanquea el extremo 5' del gen del Vh del dAb) (SEQ ID NO: 261)

5'-ATAAGGCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG-3'

Para determinar el efecto de las mutaciones, los dAbs fueron expresados en TB ONEX™ complementado con 100 µg/ml de carbenicilina y antiespumante (Sigma) a 30°C por 72 horas con agitación a 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron (4,200 rpm por 40 minutos), y los dAbs se purificaron por afinidad usando perlas de STREAMLINE™-proteína A (Amersham Biosciences, GE HEALTHCARE™, Reino Unido) como anteriormente. La afinidad y la potencia de las variantes de los anticuerpos de dominio se determinaron en el BIACORE™ T200 (los datos para los dAbs preferidos se muestran en el ejemplo 9) y en la prueba del sensor de células HEK 293T SBE-bla (los datos para los dAbs preferidos se muestran en el ejemplo 11).

Se dan a continuación las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de los dAbs del TGFR II anti-humano DOM23h-439-25 (SEQ ID NO: 234) y DOM23h-271-123 (SEQ ID NO: 236) modificados para incluir la alanina C-terminal y las mutaciones D61N, K64R o V48I:

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-40 (DOM23h-439-25 + alanina C-terminal) (SEQ ID NO: 262)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC

AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCTC
 ACGTATTGATTGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
 GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 5 CGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAG
 GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-40 (DOM23h-439-
 25 + alanina C-terminal) (SEQ ID NO: 263)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSR
 IDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPT
 GVSGTFYDYWGQGTLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-41 (DOM23h-439-
 15 25 + alanina C-terminal + 48l) (SEQ ID NO: 264)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC
 AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTATTTC
 ACGTATTGATTGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
 20 GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA

CGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-41 (DOM23h-439-

5 25 + alanina C-terminal + 48I) (SEQ ID NO: 265)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFISRI
DSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPT
GVSGTFYDYWGQGTLVTVSSA

10 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-42 (DOM23h-439-

25 + alanina C-terminal + 61N) (SEQ ID NO: 266)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC
AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCTC
15 ACGTATTGATTGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAG
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
CGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-42 (DOM23h-439-25 + alanina C-terminal + 61N) (SEQ ID NO: 267)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSR
IDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPT
5 GVS GTFYDYWGQGTLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-43 (DOM23h-439-25 + alanina C-terminal + 64R) (SEQ ID NO: 268)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
10 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC
AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCTC
ACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGCGT
GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
15 CGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-43 (DOM23h-439-25 + alanina C-terminal + 64R) (SEQ ID NO: 269)

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSR
IDSPGGRTYYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPT
GVSGTFYDYWGQGTLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-44 (DOM23h-439-25 + alanina C-terminal + 61N64R) (SEQ ID NO: 270)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC
5  AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCTC
   ACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGT
   GGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
   AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
   CGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAG
10  GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG
```

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-44 (DOM23h-439-25 + alanina C-terminal + 61N64R) (SEQ ID NO: 271)

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSR
15  IDSPGGRTYYANSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPT
   GVSGTFYDYWGQGTLVTVSSA
```

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-130 (DOM23h-271-123 + alanina C-terminal) (SEQ ID NO: 272)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
20  GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
```

AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
 GGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 CAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGG
 5 GGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-130 (DOM23h-271-
 123 + alanina C-terminal) (SEQ ID NO: 273)

EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
 10 AIEPIGHRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAP
 GEKWARRWDLDYWGQGTLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-131 (DOM23h-
 271-123 + alanina C-terminal + 61N) (SEQ ID NO: 274)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
 AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAG
 GGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 20 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 CAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGG
 GGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-131 (DOM23h-271-123 + alanina C-terminal + 61N) (SEQ ID NO: 275)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
 AIEPIGHRITYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAP
 5 GEKWARRWDLDYWGQGTLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-132 (DOM23h-271-123 + alanina C-terminal + 64R) (SEQ ID NO: 276)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 10 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
 AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGCGT
 GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 15 CAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGG
 GGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-132 (DOM23h-271-123 + alanina C-terminal + 64R) (SEQ ID NO: 277)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
 AIEPIGHRITYYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAP
 20 GEKWARRWDLDYWGQGTLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-133 (DOM23h-271-123+ alanina C-terminal + 61N64R) (SEQ ID NO: 278)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
 5 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
 AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTG
 GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
 AGGCGCCCGGCGAGAAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGG
 10 GTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC GCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-133 (DOM23h-271-123+ alanina C-terminal + 61N64R) (SEQ ID NO: 279)

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
 15 AIEPIGHRITYYANSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAP
 GEKWARRWDLDYWGGQGLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-134 (DOM23h-271-123+ alanina C-terminal + 48I) (SEQ ID NO: 280)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
 20 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTTC

GCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
 GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
 ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
 AGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGG
 5 GTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-134 (DOM23h-271-
 123+ alanina C-terminal + 48I) (SEQ ID NO: 281)

EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWISAI
 10 EPIGHRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGE
 KWARRWDLDYWGQGLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-135 (DOM23h-
 271-129 + alanina C-terminal) (SEQ ID NO: 282)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
 AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
 GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 20 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 CAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGGCGCTTGGACTACTGGG
 GTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-135 (DOM23h-271-129 + alanina C-terminal) (SEQ ID NO: 283)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
 AIEPIGHRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPN
 5 QRYVARGRLDYWGQGTLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-136 (DOM23h-271-129 + alanina C-terminal + 61N) (SEQ ID NO: 284)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 10 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
 GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
 AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAG
 GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 15 CAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGGCGCTTGGACTACTGGG
 GTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-136 (DOM23h-271-129 + alanina C-terminal + 61N) (SEQ ID NO: 285)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
 AIEPIGHRTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPN
 20 QRYVARGRLDYWGQGTLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-137 (DOM23h-271-129 + alanina C-terminal + 61N64R) (SEQ ID NO: 286)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAG
5  GATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTC
AGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTG
GCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAC
AGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGGCGCTTGGACTACTGGG
10 GTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG
```

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-137 (DOM23h-271-129 + alanina C-terminal + 61N64R) (SEQ ID NO: 287)

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVS
15 AIEPIGHRITYYANSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAP
NQRYVARGRLDYWGQGTLVTVSSA
```

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-47 (DOM23h-439-42 + 48I) (SEQ ID NO: 288)

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC
20 AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTATTTC
```

ACGTATTGATTGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAG
 GGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 CGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAG
 5 GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-47 (DOM23h-439-
 42 + 48I) (SEQ ID NO: 289)

EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFISRI
 10 DSPGGRTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPT
 GVSGTFYDYWGQGLTVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-48 (DOM23h-439-
 44 + 48I) (SEQ ID NO: 290)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG
 TCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGGACGGAGC
 AGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTATTTTC
 ACGTATTGATTGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGT
 GGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA
 20 AATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA
 CGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAG
 GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-48 (DOM23h-439-44 + 48I) (SEQ ID NO: 291)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFISRI
DSPGGRTYYANSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPT

5 GVSGTFYDYWGQGTLVTVSSA

EJEMPLO 9

Análisis de cinética Biacore de anticuerpos de dominio madurados por afinidad

10

Se inmovilizó IgG anti-humano sobre un chip Biacore CM4 mediante acoplamiento de amina primaria, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se capturaron TGF- β RII/Fc de humano, TGF- β RII/Fc de Cynomolgus o fragmento Fc de humano, sobre esta superficie. Los anticuerpos de dominio se hicieron pasar sobre los dos receptores capturados a concentraciones de 100, 10 y 1 nM (dAbs DOM23h-439) o 100, 25 y 6.25 nM (dAbs DOM23h-271). Sólo la concentración de 100 nM de cada dAb se hizo pasar sobre el fragmento Fc de humano para confirmar la especificidad de unión con el dominio extracelular del TGF- β RII. Una inyección de regulador de pH sobre la superficie del antígeno capturado se usó como doble referencia. La superficie capturada se regeneró, después de cada inyección del anticuerpo de dominio, usando solución de cloruro de magnesio 3 M; la regeneración removió el antígeno capturado, pero no afectó significativamente

15

20

la capacidad de la superficie para capturar el antígeno en un ciclo subsiguiente. Todas las corridas se llevaron a cabo a 25°C usando regulador de pH de HBS-EP como regulador de pH de la corrida. Los datos se generaron usando el BIACORE™ T200 y se ajustaron al modelo de unión 1:1 inherente al software. El cuadro 14 muestra la cinética de unión de los dAbs puestos a prueba. Los dAbs DOM23h-271 y los linajes de DOM23h-439 se hicieron correr en experimentos separados.

CUADRO 14

	Muestra	TGFBRII de humano			TGFBRII de Cynomolgus		
		Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (M)	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (M)
5	DOM23h-271-123	2.89E+06	2.93E-04	1.02E-10	3.08E+06	3.20E-04	1.04E-10
	DOM23h-271-129	5.55E+06	4.11E-04	7.41E-11	6.00E+06	4.27E-04	7.12E-11
	DOM23h-271-130	2.51E+06	3.09E-04	1.23E-10	2.61E+06	3.24E-04	1.24E-10
10	DOM23h-271-131	6.26E+06	1.36E-04	2.17E-11	6.81E+06	1.44E-04	2.12E-11
	DOM23h-271-132	1.22E+07	2.22E-04	1.82E-11	1.29E+07	2.38E-04	1.85E-11
	DOM23h-271-133	8.47E+06	7.70E-05	9.09E-12	8.84E+06	8.71E-05	9.85E-12
15	DOM23h-439-25	7.77E+06	6.34E-04	8.17E-11	8.99E+06	2.73E-03	3.04E-10
	DOM23h-439-35	2.26E+07	2.22E-04	9.83E-12	2.32E+07	6.75E-04	2.91E-11
	DOM23h-439-40	1.34E+07	1.39E-03	1.04E-10	9.34E+06	3.42E-03	3.66E-10
20	DOM23h-439-41	1.81E+07	1.87E-04	1.04E-11	1.57E+07	5.22E-04	3.33E-11
	DOM23h-439-42	4.09E+07	1.31E-04	3.20E-12	3.72E+07	4.10E-04	1.10E-11
	DOM23h-439-43	8.83E+06	3.73E-04	4.23E-11	8.04E+06	1.20E-03	1.49E-10

CUADRO 14 (CONTINUACIÓN)

	TGFBRII de humano			TGFBRII de Cynomolgus		
Muestra	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (M)	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (M)
DOM23h-439-44	2.39E+07	6.91E-05	2.89E-12	2.17E+07	1.47E-04	6.77E-12

EJEMPLO 10**Evaluación biofísica de los dAbs madurados por afinidad**

La estabilidad térmica de los dAbs se determinó usando calorimetría de barrido diferencial (DSC). Los dAbs fueron dializados durante la noche en regulador de pH de PBS y ajustados a una concentración final de 1 mg/ml. Se usó regulador de pH de diálisis como referencia para todas las muestras. Se llevó a cabo DSC usando un microcalorímetro de celda capilar VP-DSC (GE healthcare/Microcal), a una tasa de calentamiento de 180°C/hora. Una escala de exploración típica fue de 20 a 90°C para el regulador de pH de referencia y la muestra de proteína. Después de cada par de regulador de pH de referencia y muestra, la celda capilar se limpió con una solución de Decon a 5% (Fisher-Scientific) en agua seguido de PBS. Los trazos de los datos resultantes se analizaron usando el software Origin 7.0. El

trazo de DSC obtenido a partir del regulador de pH de referencia se sustrajo del trazo de la muestra. La concentración molar precisa de la muestra se ingresó en la rutina del análisis de datos para dar valores para los valores de temperatura de fusión (T_m), entalpía (ΔH) y entalpía de Van't Hoff (ΔH_v). Los

5 datos fueron ajustados a un modelo no de 2 estados. Se obtuvieron valores de dependencia y de mejor ajuste con 1 o 2 eventos de transición. Se determinó también la temperatura de despliegue por la integración a partir del termograma cero de cada muestra. Este valor se determinó entonces como la temperatura a la cual 4% de la muestra fue desplegado.

CUADRO 14A

	Nombre de la proteína	Tm aparente (°C)	Temperatura de inicio (°C)
	DOM23h-439-21	60.66	52.5
5	DOM23h-439-25	56.34	49
	DOM23h-439-30	57.17	50
	DOM23h-439-32	55.01	49
	DOM23h-439-33	58.93	51
	DOM23h-439-34	56.78	50
	DOM23h-855-42	61.90	55
	DOM23h-855-43	66.81	58.6
10	DOM23h-855-44	63.38	56
	DOM23h-271-123	54.82	50.6
	DOM23h-271-124	58.16	52
	DOM23h-271-125	58.26	55

15 Análisis del estado en solución mediante cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser de ángulos múltiples (SEC–MALLS)

20 Para determinar si los dAbs son monoméricos o forman oligómeros de mayor orden en solución, se analizaron mediante SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser de ángulos múltiples). Un sistema de CLAR serie 1100 de Agilent con un cargador automático de muestras y un detector UV (controlado por el software Empower) se conectó al detector Wyatt Mini Dawn Treos (dispersión de luz

láser (LS)) y el detector Wyatt Optilab rEX DRI (índice de refracción (RI) diferencial). Los detectores se conectaron en el siguiente orden -UV-LS-RI. Los instrumentos RI y LS operan a una longitud de onda de 658 nm; la señal UV se monitoreó a 280 nm y 220 nm. Se separaron los anticuerpos de dominio (50 microlitros de inyección a una concentración de 1 mg/mL en PBS), de acuerdo con sus propiedades hidrodinámicas mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna TSK2000. La fase móvil fue NaCl 0.2 M, NaPO₄ 0.1 M y n-propanol a 15%. La intensidad de la luz dispersa mientras la proteína se hizo pasar a través del detector, se midió como una función del ángulo. Esta medición tomada en conjunto con la concentración de proteína determinada usando el detector RI, permitió el cálculo de la masa molar usando ecuaciones apropiadas (parte integral del software de análisis Astra v.5.3.4.14). El estado en solución como porcentaje de monómero, se muestra en el cuadro 15.

CUADRO 15

		Porcentaje de monómero
	DOM23h-439-21	100%
	DOM23h-439-25	100%
5	DOM23h-439-30	100%
	DOM23h-439-32	100%
	DOM23h-439-33	98.2%
	DOM23h-439-34	97.7%
	DOM23h-855-42	83.8%
	DOM23h-855-43	83%
10	DOM23h-855-44	64.7%
	DOM23h-271-123	100%
	DOM23h-271-124	97.4%

EJEMPLO 11

15 **Inhibición del TGF β -RII por los dAbs madurados por afinidad en la prueba del sensor de células HEK 293T SBE-bla**

La prueba se llevó a cabo exactamente como se esbozó en el ejemplo 4, prueba h2.

20 La prueba se llevó a cabo veces múltiples para obtener un promedio y una escala de valores que se resumen en el cuadro 16. Se calculó la media aritmética IC50 usando el logaritmo de los valores de la IC50, y se calculó la escala añadiendo y sustrayendo el logaritmo de la desviación

estándar a partir de la IC50 promedio, y transformando entonces de nuevo a la IC50. Se cubrieron los parámetros de control de calidad de la prueba: los factores Z robustos fueron mayores de 0.4, y la EC80 del TGF- β estuvo dentro de 6 veces la concentración añadida a la prueba. Los resultados se muestran en el cuadro 16.

CUADRO 16

Datos de prueba funcionales para clones específicos de humano más

dAb sustituto del VH

10

15

20

	IC50 nM			
		Valor medio	Escala de IC50 (+/- log SD)	n
DOM23h-271-123		18.3	9.8-34.1	11
DOM23h-271-129		22.7	16.6-31.1	4
DOM23h-271-130		37.0	15.1-90.7	4
DOM23h-271-131		6.3	4.5-8.9	4
DOM23h-271-132		21.0	16.1-27.5	4
DOM23h-271-133		2.4	1.5-3.8	4
DOM23h-439-25		4.0	1.1-14.7	17
DOM23h-439-35		0.5	0.4-0.7	3
DOM23h-439-37		0.7	0.2-2.2	4
DOM23h-439-40		14	10.8-18.8	6
DOM23h-439-41		1.7	1.3-2.3	4
DOM23h-439-42		0.7	0.2-2.7	8
DOM23h-439-43		1.0	0.7-1.4	4
DOM23h-439-44		1.3	0.5-3.3	6
Sustituto del VH 2	>	25119	25119	13

CUADRO DE CONCORDANCIA DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
1	DOM23h-802	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
2	DOM23h-803	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
3	DOM23h-813	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
4	DOM23h-815	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
5	DOM23h-828	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
6	DOM23h-830	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
7	DOM23h-831	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
8	DOM23h-840	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
9	DOM23h-842	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
10	DOM23h-843	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
11	DOM23h-850	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
12	DOM23h-854	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
13	DOM23h-855	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
14	DOM23h-865	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
15	DOM23h-866	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
16	DOM23h-874	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
17	DOM23h-883	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
18	DOM23h-903	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
19	DOM23m-4	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación

	SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
	20	DOM23m-29	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
	21	DOM23m-32	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
5	22	DOM23m-62	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
	23	DOM23m-71	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
	24	DOM23m-72	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
	25	DOM23m-81	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
	26	DOM23m-99	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
10	27	DOM23m-101	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
	28	DOM23m-352	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
	29	DOM23h-271-21	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad
	30	DOM23h-271-22	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad
	31	DOM23h-271-27	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad
15	32	DOM23h-271-101	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad
	33	DOM23h-271-102	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad
	34	DOM23h-271-105	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad
	35	DOM23h-271-106	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad
	36	DOM23h-271-114	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad
20	37	DOM23h-271-39	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad más mutación D61R K64D
	38	DOM23h-271-40	Secuencia de aminoácidos – madurada por afinidad más mutación D61R K64F

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
39	DOM23h-802	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
40	DOM23h-803	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
41	DOM23h-813	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
42	DOM23h-815	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
43	DOM23h-828	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
44	DOM23h-830	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
45	DOM23h-831	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
46	DOM23h-840	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
47	DOM23h-842	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
48	DOM23h-843	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
49	DOM23h-850	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
50	DOM23h-854	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
51	DOM23h-855	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
52	DOM23h-865	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
53	DOM23h-866	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
54	DOM23h-874	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
55	DOM23h-883	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
56	DOM23h-903	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
57	DOM23m-4	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
58	DOM23m-29	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
59	DOM23m-32	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
60	DOM23m-62	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
61	DOM23m-71	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
62	DOM23m-72	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
63	DOM23m-81	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
64	DOM23m-99	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
65	DOM23m-101	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
66	DOM23m-352	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
67	DOM23h-271-21	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad
68	DOM23h-271-22	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad
69	DOM23h-271-27	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad
70	DOM23h-271-101	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad
71	DOM23h-271-102	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad
72	DOM23h-271-105	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad
73	DOM23h-271-106	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad
74	DOM23h-271-114	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad
75	DOM23h-271-39	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad más mutación D61R K64D
76	DOM23h-271-40	Secuencia de ácido nucleico – madurada por afinidad más mutación D61R K64F

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
77	DOM23h-802	CDR1
113	..	CDR2
149	..	CDR3
78	DOM23h-803	CDR1
114	..	CDR2
150	..	CDR3
79	DOM23h-813	CDR1
115	..	CDR2
151	..	CDR3
80	DOM23h-815	CDR1
116	..	CDR2
152	..	CDR3
81	DOM23h-828	CDR1
117	..	CDR2
153	..	CDR3
82	DOM23h-830	CDR1
118	..	CDR2
154	..	CDR3
83	DOM23h-831	CDR1
119	..	CDR2
155	..	CDR3
84	DOM23h-840	CDR1
120	..	CDR2
156	..	CDR3
85	DOM23h-842	CDR1
121	..	CDR2
157	..	CDR3
86	DOM23h-843	CDR1
122	..	CDR2
158	..	CDR3
87	DOM23h-850	CDR1
123	..	CDR2
159	..	CDR3
88	DOM23h-854	CDR1
124	..	CDR2
160	..	CDR3
89	DOM23h-855	CDR1
125	..	CDR2
161	..	CDR3
90	DOM23h-865	CDR1
126	..	CDR2

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
162	..	CDR3
91	DOM23h-866	CDR1
127	..	CDR2
163	..	CDR3
92	DOM23h-874	CDR1
128	..	CDR2
164	..	CDR3
93	DOM23h-883	CDR1
129	..	CDR2
165	..	CDR3
94	DOM23h-903	CDR1
130	..	CDR2
166	..	CDR3
95	DOM23m-4	CDR1
131	..	CDR2
167	..	CDR3
96	DOM23m-29	CDR1
132	..	CDR2
168	..	CDR3
97	DOM23m-32	CDR1
133	..	CDR2
169	..	CDR3
98	DOM23m-62	CDR1
134	..	CDR2
170	..	CDR3
99	DOM23m-71	CDR1
135	..	CDR2
171	..	CDR3
100	DOM23m-72	CDR1
136	..	CDR2
172	..	CDR3
101	DOM23m-81	CDR1
137	..	CDR2
173	..	CDR3
102	DOM23m-99	CDR1
138	..	CDR2
174	..	CDR3
103	DOM23m-101	CDR1
139	..	CDR2
175	..	CDR3
104	DOM23m-352	CDR1

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
140	..	CDR2
176	..	CDR3
105	DOM23h-271-21	CDR1
141	..	CDR2
177	..	CDR3
106	DOM23h-271-22	CDR1
142	..	CDR2
178	..	CDR3
107	DOM23h-271-27	CDR1
143	..	CDR2
179	..	CDR3
108	DOM23h-271-101	CDR1
144	..	CDR2
180	..	CDR3
109	DOM23h-271-102	CDR1
145	..	CDR2
181	..	CDR3
110	DOM23h-271-105	CDR1
146	..	CDR2
182	..	CDR3
111	DOM23h-271-106	CDR1
147	..	CDR2
183	..	CDR3
112	DOM23h-271-114	CDR1
148	..	CDR2
184	..	CDR3
185	DOM008	iniciador
186	DOM009	iniciador
187	DOM172	iniciador
188	DOM173	iniciador
189	271-7R1deg CDR1	iniciador
190	271-7R2deg CDR2	iniciador

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
191	271-7R3deg CDR3	iniciador
192	PE008	iniciador
193	271-6164 R	iniciador
194	271-6164 deg-F	iniciador
195	AS1309	iniciador
196	271-6164 NR-F	iniciador
197	DOM57	iniciador
198	DOM6	iniciador
199	DOM23h-271	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
200	DOM23h-271	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
201	DOM23h-271-7	Secuencia de aminoácidos – clon sin afectación
202	DOM23h-271-7	Secuencia de ácido nucleico – clon sin afectación
203	DOM23h-855-21	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado con la prueba
204	DOM23h-855-21	Secuencia de aminoácidos – clon madurado con la prueba
205	DOM23h-843-13	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado con la prueba
206	DOM23h-843-13	Secuencia de aminoácidos – clon madurado con la prueba
207	DOM23h-439-20	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado con la prueba
208	DOM23h-439-20	Secuencia de aminoácidos – clon madurado con la prueba
209	PEP-26-F	Iniciador
210	PeIB NcoVh	Iniciador
211	PEP011	Iniciador
212	DOM-271-50	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
213	DOM-271-50	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
214	DOM-271-50	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR (*duplicado del 213 anterior*)

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
215	PEP044	Iniciador
216	23h-439-20 CDRH1	Iniciador
217	23h-439-20 CDRH2	Iniciador
218	23h-439-20 CDRH3	Iniciador
219	23h-843-13 CDRH1	Iniciador
220	23h-843-13 CDRH2	Iniciador
221	23h-843-13 CDRH3	Iniciador
222	23h-855-21 CDRH1	Iniciador
223	23h-855-21 CDRH2	Iniciador
224	23h-855-21 CDRH3	Iniciador
225	H1-271-43 R	Iniciador
226	H2p1-271-43F	Iniciador
227	H2p2-271-43 F	Iniciador
228	H3p1-271-43 F	Iniciador
229	H3p2-271-43 F	Iniciador
230	H3p3-271-43 F	Iniciador
231	PEP011VHStopNotIR	Iniciador
232	Nco1 VH F	Iniciador
233	DOM23h-439-25	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
234	DOM23h-439-25	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
235	DOM23h-271-123	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
236	DOM23h-271-123	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
237	DOM23h-439-35	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
238	DOM23h-439-35	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
239	DOM23h-271-129	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
240	DOM23h-271-129	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
241	DOM23h-271-123	CDR1
242	DOM23h-271-123	CDR2
243	DOM23h-271-123	CDR3
244	DOM23h-271-129	CDR1
245	DOM23h-271-129	CDR2
246	DOM23h-271-129	CDR3

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
247	DOM23h-439-25	CDR1
248	DOM23h-439-25	CDR2
249	DOM23h-439-25	CDR3
250	DOM23h-439-35	CDR1
251	DOM23h-439-35	CDR2
252	DOM23h-439-35	CDR3
253	439 48I SDM F	Iniciador
254	439 61N SDM F	Iniciador
255	439 64R SDM F	Iniciador
256	439 61N 64R SDM F	Iniciador
257	271 61N SDM F	Iniciador
258	271 64R SDM F	Iniciador
259	271 61N 64R SDM F	Iniciador
260	567 +A rev	Iniciador
261	21-23 Fwd	Iniciador
262	DOM23h-439-40	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
263	DOM23h-439-40	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
264	DOM23h-439-41	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
265	DOM23h-439-41	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
266	DOM23h-439-42	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
267	DOM23h-439-42	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
268	DOM23h-439-43	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
269	DOM23h-439-43	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
270	DOM23h-439-44	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
271	DOM23h-439-44	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
272	DOM23h-271-130	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
273	DOM23h-271-130	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR

SEQ ID NO:	Número de dominio	Descripción
274	DOM23h-271-131	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
275	DOM23h-271-131	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
276	DOM23h-271-132	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
277	DOM23h-271-132	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
278	DOM23h-271-133	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
279	DOM23h-271-133	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
280	DOM23h-271-134	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
281	DOM23h-271-134	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
282	DOM23h-271-135	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
283	DOM23h-271-135	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
284	DOM23h-271-136	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
285	DOM23h-271-136	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
286	DOM23h-271-137	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
287	DOM23h-271-137	Secuencia de aminoácidos – clon madurado por afinidad dirigido por la CDR
288	DOM23h-439-47	Secuencia de ácido nucleico - DOM23h-439-42 + 48l
289	DOM23h-439-47	Secuencia de aminoácidos - DOM23h-439-42 + 48l
290	DOM23h-439-48	Secuencia de ácido nucleico - DOM23h-439-44 + 48l
291	DOM23h-439-48	Secuencia de aminoácidos - DOM23h-439-44 + 48l

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 y 291, teniendo hasta 5 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido, en
10 cualquier combinación.

 2.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 234 o 236, teniendo hasta 5 sustituciones, deleciones o adiciones de
15 aminoácido, en cualquier combinación.

 3.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado además porque dichas sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido no están dentro de la CDR3.

20 4.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado además porque dichas sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido no están dentro de alguna de las CDRs.

5.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 y
5 291.

6.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 234 o 236.

7.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-
10 TGFbetaRII de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado además porque el dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII comprende además un residuo de alanina C-terminal.

8.- Un polipéptido aislado que comprende un dominio variable
15 individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho polipéptido aislado se une al TGFbetaRII.

9.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un
20 polipéptido de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque comprende adicionalmente por lo menos uno de los siguientes aminoácidos seleccionados del grupo: R en la posición 39, I en la posición 48, D en la posición 53, N en la posición 61, R en la posición 61, K en la posición

61, R en la posición 64, F en la posición 64, D en la posición 64, E en la posición 64, M en la posición 64, Y en la posición 64, H en la posición 102, o S en la posición 103 del dominio variable individual de inmunoglobulina, dichas posiciones estando de acuerdo con la convención de numeración de Kabat.

5 10.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o el polipéptido de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque comprende una R o una K en la posición 61.

11.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un
10 polipéptido de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque comprende adicionalmente una de las siguientes combinaciones de aminoácido seleccionada del grupo: N en la posición 61 y R en la posición 64; R en la posición 61 y E en la posición 64; R en la posición 61 y M en la posición 64; R en la posición 61 y F en la posición 64; R en la posición 61 y Y
15 en la posición 64; y R en la posición 61 y D en la posición 64 del dominio variable individual de inmunoglobulina.

12.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o el polipéptido de conformidad con la reivindicación 9, 10 u 11, caracterizado además porque comprende un residuo de isoleucina en la
20 posición 48.

13.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o el polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque dicho dominio variable

individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido se une al TGFbetaRII de humano.

14.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o el polipéptido de conformidad con la reivindicación 13,
5 caracterizado además porque dicho dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido se une también al TGFbetaRII de ratón y/o el TGFbetaRII de Cynomolgus.

15.- El dominio variable individual de inmunoglobulina o el polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14,
10 caracterizado además porque dicho dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido neutraliza la actividad del TGFbeta.

16.- El dominio variable individual de inmunoglobulina o el polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15,
15 caracterizado además porque dicho dominio variable individual de inmunoglobulina o polipéptido inhibe la unión del TGFbeta al TGFbetaRII.

17.- Un ácido nucleico aislado que codifica para un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

18.- Una molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con
20 la reivindicación 16, caracterizada porque comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo de: SEQ ID NOs: 39-76, 203, 205, 207, 212, 233, 235, 237, 239, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288 o 290.

19.- Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17 o la reivindicación 18.

20.- Una célula hospedera que comprende un ácido nucleico o un vector de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.

5 21.- Un método para producir un polipéptido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, el método comprendiendo mantener una célula hospedera de la reivindicación 20 bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico o vector, por lo cual un polipéptido que
10 comprende una variable individual de inmunoglobulina es producido.

22.- Un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para usarse como un medicamento.

23.- Una composición farmacéutica que comprende un dominio
15 variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

24.- Un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido de la reivindicación 22 o una composición farmacéutica de la reivindicación 23, para el tratamiento de una enfermedad
20 asociada con la señalización del TGFbeta.

25.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido o composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque la enfermedad asociada con

la señalización del TGFbeta se selecciona del grupo de: fibrosis de tejidos, tal como fibrosis pulmonar que incluye fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis del hígado, que incluye cirrosis y hepatitis crónica; artritis reumatoide; trastornos oculares; fibrosis de la piel, que incluye queloide de la piel y contractura de Dupuytren; fibrosis del riñón tal como nefritis y nefrosclerosis, curación de
5 heridas; y una condición vascular tal como restenosis.

26.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, polipéptido o composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 22, para usarse en el tratamiento de fibrosis de tejidos o para su
10 uso en la curación de heridas y/o reducción de la cicatrización.

27.- El dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la reivindicación 22, 24 o 25, caracterizado además porque la enfermedad es enfermedad queloide o contractura de Dupuytren.

15 28.- El uso de un dominio variable individual anti-TGFbetaRII o polipéptido como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con la señalización del TGFbeta.

29.- Un método de tratamiento y/o prevención de una condición
20 mediada por el TGFbeta en un paciente humano, el método comprendiendo el paso de: administrar una composición que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 al paciente humano.

30.- Un kit que comprende un dominio variable individual anti-TGFbetaRII o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, y un dispositivo para aplicar dicho dominio variable individual o polipéptido a la piel.

31.- El kit de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado
5 además porque el dispositivo es un dispositivo de suministro intradérmico.

RESUMEN DE LA INVENCION

La descripción provee un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII; convenientemente, un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII de conformidad con la descripción, es uno que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 1-28 teniendo hasta 5 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido; la descripción provee además un polipéptido y composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada con la señalización del TGFbeta, y convenientemente una enfermedad seleccionada del grupo de: fibrosis de tejidos, tal como fibrosis pulmonar que incluye fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis del hígado, que incluye cirrosis y hepatitis crónica; artritis reumatoide; trastornos oculares; fibrosis de la piel, que incluye queloide de la piel; contractura de Dupuytren; fibrosis del riñón tal como nefritis y nefrosclerosis; curación de heridas; reducción de la cicatrización; y una condición vascular tal como restenosis.

20

18B

P13/817F

PB63488FFSeqList (1)

SEQUENCE LISTING

<110> BEATON, Andrew
DIMECH, Caroline
ERTL, Peter F.
FORD, Susannah
MCADAM, Ruth

<120> LIGANDS THAT BIND TGF-BETA RECEPTOR I

<130> PB64388

<150> 61/430,235

<151> 2011-01-06

<160> 291

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 1

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Glu Gly
 20          25          30
Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Ala Ile Leu Ala Ala Gly Ser Asn 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 Lys Arg Gln Glu Arg Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ala Gly
 20          25          30

```

PB63488FFSeqList (1)

Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Arg Asp Gly Thr Arg 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 His Asp Gly His Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Asp Asp
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gln Pro Asp Gly His Thr 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 Glu Gln Asp Val Lys Gly Ser Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 4

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ala Glu Asp
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asp Pro Gln Gly Gln His 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 Gln Ser Thr Gly Ser Ala Thr Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

PB63488FFSeqList (1)

Thr Leu Val¹⁰⁰ Thr Val Ser Ser¹¹⁰
¹⁰⁵
¹¹⁵

<210> 5
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 5
 Glu Val¹ Gln Leu⁵ Leu Glu Ser Gly Gly¹⁰ Gly Leu Val¹⁵ Gln Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg²⁰ Leu Ser Cys Ala Ala²⁵ Ser Gly Phe Thr Phe³⁰ Met Ser Tyr
 Arg Met Trp³⁵ Trp Val Arg Gln Ala⁴⁰ Pro Gly Lys Gly Leu⁴⁵ Glu Trp Val
 Ser Ala⁵⁰ Ile Ser Pro Ser Gly⁵⁵ Ser Asp Thr Tyr Tyr⁶⁰ Ala Asp Ser Val
 Lys Gly Arg Phe Thr⁶⁵ Ile Ser Arg Asp Asn⁷⁰ Ser Lys Asn Thr Leu Tyr⁸⁰
 Leu Gln Met Asn⁸⁵ Ser Leu Arg Ala Glu Asp⁹⁰ Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹⁵
 Ala Lys Gln Val¹⁰⁰ Val Glu Tyr Ser Arg¹⁰⁵ Thr His Lys Gly Val¹¹⁰ Phe Asp
 Tyr Trp Gly¹¹⁵ Gln Gly Thr Leu Val¹²⁰ Thr Val Ser Ser

<210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 6
 Glu Val¹ Gln Leu⁵ Leu Glu Ser Gly Gly¹⁰ Gly Leu Val¹⁵ Gln Pro Gly Gly
 Phe Leu Arg²⁰ Leu Ser Cys Ala Ala²⁵ Ser Gly Phe Thr Phe³⁰ Glu Gly Tyr
 Arg Met Trp³⁵ Trp Val Arg Gln Ala⁴⁰ Pro Gly Lys Gly Leu⁴⁵ Glu Trp Val
 Ser Ala⁵⁰ Ile Asp Ser Leu Gly⁵⁵ Asp Arg Thr Tyr Tyr⁶⁰ Ala Asp Ser Val
 Lys Gly Arg Phe Thr⁶⁵ Ile Ser Arg Asp Asn⁷⁰ Ser Lys Asn Thr Leu Tyr⁸⁰
 Leu Gln Met Asn⁸⁵ Ser Leu Arg Ala Glu Asp⁹⁰ Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹⁵
 Ala Lys Gln Gly¹⁰⁰ Leu Thr His Gln Ser¹⁰⁵ Pro Ser Thr Phe Asp¹¹⁰ Tyr Trp
 Gly Gln Gly¹¹⁵ Thr Leu Val Thr Val¹²⁰ Ser Ser

<210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 7

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Glu Ala Tyr
 20      25      30
Lys Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Tyr Ile Thr Pro Ser Gly Gly Gln 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 Tyr Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100      105      110
Thr Val Ser Ser
 115

```

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 8

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Asp Gly
 20      25      30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Ala Ile Glu Gly Ala Gly Ser Asp 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 Gln Ala Ser Arg Asn Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

```

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 9

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Asp Asp Ser
 20      25      30

```

PB63488FFSeqList (1)

Glu Met Ala Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Leu Ile Arg Arg Asn Gly Asn Ala 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 Val Thr Lys Asp Arg Ser Val Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Asp Gln Asp
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Ser Gly Gly His Arg 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 Gln Asn Glu Ser Gly Arg Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Asp Ala Ala
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ala Asp Ile Gly Asn Thr 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 Gln Ser Gly Ser Glu Asp His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

PB63488FFSeqList (1)

100
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
105 110
115

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 12
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ala Gln Asp
20 25 30
Arg Met Trp 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 Gln Asp Leu His Gly Thr Ser Ser Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 13
Glu Val Gln Leu Leu 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 Glu Asn Thr
20 25 30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Asp Pro Lys Gly Ser His 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 Gln Arg Glu Leu Gly Lys Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 14

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Arg	Ser	Tyr
			20					25					30		
Glu	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Lys	Ile	Asp	Pro	Ser	Gly	Arg	Phe	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	Gly	Arg	Thr	Asp	Leu	Gln	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 15

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asn	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Arg	Trp	Ala	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Tyr	Ile	Thr	Pro	Lys	Gly	Asp	His	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	Glu	Ser	Leu	His	Asn	Glu	Arg	Val	Lys	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115				120								

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 16

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		

PB63488FFSeqList (1)

Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Val	Ile	Asp	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	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	Gln	Gln	Ala	Gly	Ser	Ala	Met	Gly	Glu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 17
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Val	Asn	Tyr
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Lys	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	His	Gly	Leu	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser												
		115													

<210> 18
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asn	Asp	Met
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Val	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Asn	Arg	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	Gly	Leu	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val

Thr Val Ser 100
115 Ser

<210> 19
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 19
Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Trp Ile Glu Lys Thr Gly Asn Lys 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 Ala Gly Arg His Ile Lys Val Arg Ser Arg Asp Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 20
Glu Val Gln Leu Leu 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 Lys Arg Tyr
20 25 30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Asn Asp Leu Gly Ser Leu 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 Gly Asn Ile Ser Met Val Arg Pro Gly Ser Trp Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 21

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Glu Tyr
 20      25      30
Pro Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gln Arg 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 Ser His Thr Gly Thr Val Arg His Leu Glu Thr Phe Asp Tyr
 100     105     110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115     120

```

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 22

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Gln Glu
 20      25      30
Ser Met Tyr 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 Ser Gly Thr Arg Ile Lys Gln Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100     105     110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115     120

```

<210> 23

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 23

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Asp Tyr
 20      25      30

```

PB63488FFSeqList (1)

Arg Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asp Pro Thr Gly Leu Arg 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 Ile Lys Trp Gly Glu Met Gly Ser Tyr Lys Thr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 24
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Met Asp Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Met Ile Arg Glu Asp Gly Gly Lys 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 Ala Arg Val Pro Tyr Arg Arg Gly His Arg Asp Asn Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 25
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Glu Pro Val
 20 25 30
 Ile Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Ala Arg Gly Gly Gly 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 Pro Gly Arg His Leu Ser Gln Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

PB63488FFSeqList (1)

100
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 105 110
 115 120

<210> 26
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 26
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Asp Arg Tyr
 20 25 30
 Arg Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Asp Pro Ala Gly Met Leu 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 Arg Leu Ala Ser Arg Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 27
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Arg Ser Asp Gly Val Arg 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 Arg Ala Lys Asn Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 28

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20      25      30
Lys Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Leu Ile Phe Pro Asn Gly Val Pro Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Lys Tyr Ser Gly Gln Gly Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 29

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 29

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
 20      25      30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Lys Gln Met Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Lys Phe Arg Trp Asp
100      105      110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser
115      120

```

<210> 30

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 30

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
 20      25      30

```

PB63488FFSeqList (1)

Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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 Gln Met Pro Gly Gln Lys Trp Met Ala Lys Ser Arg Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Gln Lys 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 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser
 115 120

<210> 32
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Gly Arg Lys Asp

PB63488FFSeqList (1)

Tyr Trp Gly 100
115 Gln Gly Thr Leu Val 105 110
120 Thr Val Ser Ser

<210> 33
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 33
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 34
Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Glu Tyr
20 25 30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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 Gln Ile Pro Gly Gln Arg Trp Thr Gly Asn Ser Arg Phe Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 35

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
 20      25      30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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 Gln Phe Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Ser Asp
 100      105      110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115      120

```

<210> 36

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 36

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
 20      25      30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Gly Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp
 100      105      110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115      120

```

<210> 37

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 37

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
 20      25      30

```

PB63488FFSeqList (1)

Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Ser	Val
	50					55					60				
Asp	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	Gln	Met	Pro	Gly	Gln	Lys	Trp	Met	Ala	Lys	Ser	Arg	Phe	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> 38
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 38

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Glu	Tyr
			20					25				30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Ser	Val
	50					55					60				
Phe	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	Gln	Met	Pro	Gly	Gln	Lys	Trp	Met	Ala	Lys	Ser	Arg	Phe	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> 39
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 39

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttagt	gaggggacga	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctagagtg	ggtctcagct	attttggctg	ctggttctaa	tacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaaaagagg	300
caggagcggg	atgggtttga	ctactggggg	cagggaaccc	tggtcaccgt	ctcgagc	357

<210> 40
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

PB63488FFSeqList (1)

<223> Nucleic acid sequence

<400> 40

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	caccttttagt	gctgggcgga	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctagagtg	ggtctcagcg	attaatcggg	atgggtactag	gacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgtgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaacatgat	300
gatggtcatg	gtaattttga	ctactgggggt	caggggaaccc	tggtcaccgt	ctcgagc	357

<210> 41

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 41

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatc	cacctttacg	gatgatagga	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctagagtg	ggtctcagct	attcagcctg	atgggtcatac	gacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	ggaacaggat	300
gttaaggggt	cgtcttcggt	tgactactgg	ggtcagggaa	ccctgggtcac	cgtctcgagc	360

<210> 42

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 42

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttcg	gaggatcggg	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctagagtg	ggtctcagct	attgatcctc	agggtcagca	tacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaacagtct	300
actgggtctg	ctacgtctga	ctactgggggt	caggggaaccc	tggtcaccgt	ctcgagc	357

<210> 43

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 43

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttatg	agttatagga	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctagagtg	ggtctcagct	atttctccga	gtggtagtga	tacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaacagggtg	300
gtggagtatt	cggtactca	taagggtgtg	tttgactact	ggggtcaggg	aaccctgggtc	360
accgtctcga	gc					372

<210> 44

<211> 366

<212> DNA

PB63488FFSeqList (1)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 44

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtt	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttgag	gggtatagga	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	gtctagagtg	ggcttcagct	attgattctc	tgggtgatcg	tacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagtctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaacagggg	300
cttacgcatac	agtctccgag	tacttttgac	tactggggtc	agggaaaccct	ggtcaccgct	360
tcgagc						366

<210> 45

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 45

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctggagggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttgag	gcgtataaga	tgacgtgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	gtctggagtg	ggctctcatat	attacgccgt	ctgggtgtca	gacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaatatggt	300
tcgagttttg	actactgggg	tcagggaacc	ctggtcaccg	tctcgagc		348

<210> 46

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 46

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttggg	gatggtcgta	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	gtctagagtg	ggcttcagct	attgaggggg	cgggttcgga	tacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaacaggcg	300
tcgcggaatt	cgccgtttga	ctactggggg	caggggaccc	tggtcaccgt	ctcgagc	357

<210> 47

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 47

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttgat	gatagtgaga	tggcgtgggc	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	gtctagagtg	ggcttcactt	attcggcgta	atggtaaatgc	tacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaagttagc	300
aaggatcggt	ctgtgctttt	tgactactgg	ggtcagggaa	ccctgggtcac	cgtctcgagc	360

PB63488FFSeqList (1)

<210> 48
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 48
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat caggatcgga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagct attgagagtg gtggatcatag gacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagaat 300
 gagtcggggc gttcggggtt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360

<210> 49
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 49
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat gcggttagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagcg attgcggata ttggttaatac tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagtct 300
 gggtcggagg atcattttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 50
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 50
 gaggtgcagc tgttggagtc cgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgct caggatcgga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacaggat 300
 ttgcatggta ctagttcttt gtttgactac tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 360
 agc 363

<210> 51
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 51
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgag aatacgagta tgggttgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacgt attgatccta agggtagtca tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa tacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagcgt 300
 gagttgggta agtcgcattt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360

PB63488FFSeqList (1)

<210> 52
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 52
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttcgt agttatgaga tgacttgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaaaag attgatcctt cgggtcgttt tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagggtcgg 300
 acggatcttc agctttttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 53
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 53
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg aattattgga tgcggtgggc ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcatat attactccta aggggtgatca tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc ggaatcgctt 300
 cataatgagc gtgttaagca ttttgactac tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 360
 agc 363

<210> 54
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 54
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttact agttatcgta tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagtt attgattcta ctggttcggc tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagcag 300
 gctgggagtg cgatggggga gtttgactac tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 360
 agc 363

<210> 55
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 55
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aattatcgta tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgataa gacatactac 180

PB63488FFSeqList (1)

```
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacatggg 300
ctgtcgtttg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> 56

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 56

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaat gatatgagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagtg attaatgctg atggtaatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagatggg 300
ctgccttttg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> 57

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 57

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg acttatggta tgggttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcatgg attgagaaga cgggtaataa gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagcgggg 300
aggcatatta aggtgcgttc gagggatttt gactactggg gtcagggaac cctgggtcacc 360
gtctcgagc 369
```

<210> 58

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 58

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag aggtattcta tgggttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagtt attaatgata tgggtagttt gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaggggaat 300
attagtattg tgaggccggg gagttggttt gactactggg gtcagggaac cctgggtcacc 360
gtctcgagc 369
```

<210> 59

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 59

PB63488FFSeqList (1)

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgCGtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttt gagtatccta tgggttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagtt attagtgggg atggtcagcg gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaagtcac 300
acggggactg tgaggcatct ggagacgitt gactactggg gtcagggaa cctgggtcacc 360
gtctcgagc

```

<210> 60
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

```

<400> 60
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgCGtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg caggagagta tgtattgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaagtggt 300
acgcggatta agcagggttt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360

```

<210> 61
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

```

<400> 61
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgCGtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttatg gattatagga tgtattgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaggg attgatccta ctggtttgcg gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaattaag 300
tgggggggaga tggggagtta taagactttt gactactggg gtcagggaa cctgggtcacc 360
gtctcgagc

```

<210> 62
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

```

<400> 62
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgCGtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttatg gattatgata tgagtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaatg attcgtgagg atgggtggtaa gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagcgagg 300
gtgcccttatc ggcgtgggca tagggataat tttgactact ggggtcaggg aaccctgggtc 360
accgtctcga gc

```

<210> 63
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 63

gaggtgcagc	tggttgagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cttccggatt	cacctttgag	ccggttatta	tgggggtgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctagagtg	ggtctcagct	attgaggcgc	ggggtggggg	gacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaacctggg	300
cggcatctta	gtcaggattt	tgactactgg	ggtcagggaa	ccctgggtcac	cgtctcgagc	360

<210> 64

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 64

gaggtgcagc	tggttgagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttgat	cggtatcgta	tgatgtgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctagagtg	ggtctcaacg	attgatcctg	ctgggtatgct	tacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaaaggctg	300
gcttcgcgga	gtcattttga	ctactgggggt	cagggaaccc	tggtcaccgt	ctcgagc	357

<210> 65

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 65

gaggtgcagc	tggttgagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	caccttttct	gagtatgata	tggcttgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtcttgagtg	ggtctcacgg	attcgttctg	atgggtgttag	gacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaagatcgt	300
gctaagaatg	gttggtttga	ctactgggggt	cagggaaccc	tggtcaccgt	ctcgagc	357

<210> 66

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 66

gaggtgcagc	tggttgagtc	tgggggagggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttgat	aagtataaga	tggcttgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctggagtg	ggtctcactt	atttttccga	atgggtgttcc	tacatactac	180
gcaaaactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcggtat	attactgtgc	gaaatatagt	300
ggtcagggggc	gggattttga	ctactgggggt	cagggaaccc	tggtcaccgt	ctcgagc	357

<210> 67

<211> 372

PB63488FFSeqList (1)

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 67

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacc gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatg 300
ccgggccgga agtggacggc caagtccgc tgggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
atcgtctcga gc 372

```

<210> 68

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 68

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacc gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatg 300
cccggccaga agtggatggc caagtccgc ttcgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

```

<210> 69

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 69

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacc gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcagaa gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
atcgtctcga gc 372

```

<210> 70

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 70

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacc gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300

```

PB63488FFSeqList (1)

ccggggcgta agtggactgc taatggctcgt aaggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> 71

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 71

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttgggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> 72

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 72

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> 73

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 73

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagttt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcg tctgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> 74

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 74

PB63488FFSeqList (1)

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta aggggaactgc taattcgcg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

```

<210> 75
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

```

<400> 75
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcacgctccg tggacggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatg 300
cccggccaga agtggatggc caagtccgc ttcgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

```

<210> 76
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

```

<400> 76
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcacgctccg tgttcggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatg 300
cccggccaga agtggatggc caagtccgc ttcgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

```

<210> 77
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

```

<400> 77
Ser Glu Gly Thr Met Trp
1 5

```

<210> 78
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

PB63488FFSeqList (1)

<400> 78
Ser Ala Gly Arg Met Trp
1 5

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 79
Thr Asp Asp Arg Met Trp
1 5

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 80
Ala Glu Asp Arg Met Trp
1 5

<210> 81
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 81
Met Ser Tyr Arg Met Trp
1 5

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 82
Glu Gly Tyr Arg Met Trp
1 5

<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 83

Glu Ala Tyr Lys Met Thr
1 5

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 84

Gly Asp Gly Arg Met Trp
1 5

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 85

Asp Asp Ser Glu Met Ala
1 5

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 86

Asp Gln Asp Arg Met Trp
1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 87

Asp Ala Ala Arg Met Trp
1 5

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 88
Ala Gln Asp Arg Met Trp
1 5

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 89
Glu Asn Thr Ser Met Gly
1 5

<210> 90
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 90
Arg Ser Tyr Glu Met Thr
1 5

<210> 91
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 91
Ser Asn Tyr Trp Met Arg
1 5

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 92
Thr Ser Tyr Arg Met Trp
1 5

<210> 93
<211> 6

PB63488FFSeqList (1)

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 93
Val Asn Tyr Arg Met Trp
1 5

<210> 94
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 94
Asn Asp Met Arg Met Trp
1 5

<210> 95
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 95
Thr Thr Tyr Gly Met Gly
1 5

<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 96
Lys Arg Tyr Ser Met Gly
1 5

<210> 97
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 97
Phe Glu Tyr Pro Met Gly
1 5

PB63488FFSeqList (1)

<210> 98
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 98
 Gly Gln Glu Ser Met Tyr
 1 5

<210> 99
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 99
 Met Asp Tyr Arg Met Tyr
 1 5

<210> 100
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 100
 Met Asp Tyr Asp Met Ser
 1 5

<210> 101
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 101
 Glu Pro Val Ile Met Gly
 1 5

<210> 102
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 102
 Asp Arg Tyr Arg Met Met
 1 5

PB63488FFSeqList (1)

<210> 103
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 103
 Ser Glu Tyr Asp Met Ala
 1 5

<210> 104
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 104
 Asp Lys Tyr Lys Met Ala
 1 5

<210> 105
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 105
 Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
 1 5 10

<210> 106
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 106
 Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
 1 5 10

<210> 107
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 107

PB63488FFSeqList (1)

Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 108
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 109
Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 110
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 111
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

PB63488FFSeqList (1)

<400> 112
 Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
 1 5 10

<210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 113
 Ala Ile Leu Ala Ala Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 114
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 114
 Ala Ile Asn Arg Asp Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 115
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 115
 Ala Ile Gln Pro Asp Gly His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 116
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 116
 Ala Ile Asp Pro Gln Gly Gln His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

PB63488FFSeqList (1)

<210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 117
 Ala Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 118
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 118
 Ala Ile Asp Ser Leu Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 119
 Tyr Ile Thr Pro Ser Gly Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 120
 Ala Ile Glu Gly Ala Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

PB63488FFSeqList (1)

<210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 121
 Leu Ile Arg Arg Asn Gly Asn Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 122
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 122
 Ala Ile Glu Ser Gly Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 123
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 123
 Ala Ile Ala Asp Ile Gly Asn Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 124
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 125
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 125

Arg Ile Asp Pro Lys Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 126

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 126

Lys Ile Asp Pro Ser Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 127

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 127

Tyr Ile Thr Pro Lys Gly Asp His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 128

Val Ile Asp Ser Thr Gly Ser Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

PB63488FFSeqList (1)

<223> Amino acid sequence

<400> 129

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 130

Val	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Asn	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 131

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 131

Trp	Ile	Glu	Lys	Thr	Gly	Asn	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 132

Val	Ile	Asn	Asp	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 133

PB63488FFSeqList (1)

Val Ile Ser Gly Asp Gly Gln Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 134
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 134
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly Arg

<210> 135
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 135
 Gly Ile Asp Pro Thr Gly Leu Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 136
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 136
 Met Ile Arg Glu Asp Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly Arg

<210> 137
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 137
 Ala Ile Glu Ala Arg Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

PB63488FFSeqList (1)

<210> 138
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 138
 Thr Ile Asp Pro Ala Gly Met Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 139
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 139
 Arg Ile Arg Ser Asp Gly Val Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 140
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 140
 Leu Ile Phe Pro Asn Gly Val Pro Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 141
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 141
 Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

PB63488FFSeqList (1)

<210> 142
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 142
 Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 143
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 143
 Ala Ile Glu Pro Ile Gly Gln Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 144
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 144
 Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 145
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 145
 Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 146
 <211> 18
 <212> PRT

PB63488FFSeqList (1)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 146

Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 147

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 147

Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 148

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 148

Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 149

Lys Arg Gln Glu Arg Asp Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

PB63488FFSeqList (1)

<400> 150

His Asp Asp Gly His Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 151

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 151

Glu Gln Asp Val Lys Gly Ser Ser Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 152

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 152

Gln Ser Thr Gly Ser Ala Thr Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 153

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 153

Gln Val Val Glu Tyr Ser Arg Thr His Lys Gly Val Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 154

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 154

Gln Gly Leu Thr His Gln Ser Pro Ser Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 155

Tyr Gly Ser Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 156

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 156

Gln Ala Ser Arg Asn Ser Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 157

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 157

Val Thr Lys Asp Arg Ser Val Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 158

Gln Asn Glu Ser Gly Arg Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 159

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 159

Gln Ser Gly Ser Glu Asp His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 160

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>
 <223> Amino acid sequence
 <400> 160
 Gln Asp Leu His Gly Thr Ser Ser Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 161
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence
 <400> 161
 Gln Arg Glu Leu Gly Lys Ser His Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 162
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence
 <400> 162
 Gly Arg Thr Asp Leu Gln Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 163
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence
 <400> 163
 Ser Leu His Asn Glu Arg Val Lys His Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 164
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence
 <400> 164
 Gln Gln Ala Gly Ser Ala Met Gly Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 165
 <211> 7

PB63488FFSeqList (1)

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 165
His Gly Leu Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 166
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 166
Asp Gly Leu Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 167
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 167
Ala Gly Arg His Ile Lys Val Arg Ser Arg Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 168
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 168
Gly Asn Ile Ser Met Val Arg Pro Gly Ser Trp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 169
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 169
Ser His Thr Gly Thr Val Arg His Leu Glu Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

PB63488FFSeqList (1)

<210> 170
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 170
 Ser Gly Thr Arg Ile Lys Gln Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 171
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 171
 Ile Lys Trp Gly Glu Met Gly Ser Tyr Lys Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 172
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 172
 Ala Arg Val Pro Tyr Arg Arg Gly His Arg Asp Asn Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 173
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 173
 Pro Gly Arg His Leu Ser Gln Asp Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 174
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 174
 Arg Leu Ala Ser Arg Ser His Phe Asp Tyr
 1 5 10

PB63488FFSeqList (1)

<210> 175
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 175
 Asp Arg Ala Lys Asn Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 176
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 176
 Tyr Ser Gly Gln Gly Arg Asp Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 177
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 177
 Gln Met Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Lys Phe Arg Trp Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 178
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 178
 Gln Met Pro Gly Gln Lys Trp Met Ala Lys Ser Arg Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 179
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 179

PB63488FFSeqList (1)

Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 180
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 180
 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Gly Arg Lys Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 181
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 181
 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 182
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 182
 Gln Ile Pro Gly Gln Arg Trp Thr Gly Asn Ser Arg Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 183
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 183
 Gln Phe Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Ser Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 184
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

PB63488FFSeqList (1)

<400> 184
Gln Ile Pro Gly Arg Lys Gly Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 185
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 185
agcggataac aatttcacac agga 24

<210> 186
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 186
cgccagggtt ttcccagtca cgac 24

<210> 187
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 187
ttgcaggcgt ggcaacagcg 20

<210> 188
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 188
cacgacgttg taaaacgacg gcc 23

<210> 189
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 189
gcagcctccg gattcacctt tacsgastat agsatgtgst ggggccgcca ggctccgggg 60

<210> 190

PB63488FFSeqList (1)

<211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Nucleic acid sequence

 <400> 190
 ggggtctcgag tgggtctcag csattgascc satsggsaas cgsacatact acgcagactc 60
 cgtg 64

 <210> 191
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Nucleic acid sequence

 <400> 191
 gcgggtatatt actgtgcgaa acasatsccs ggscgsaast gsacsgcsaa stcscgstts 60
 gactactggg gtcaggg 77

 <210> 192
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Nucleic acid sequence

 <400> 192
 ttgcaggcgt ggcaacagcg tcgacagagg tgcagctggt ggag 44

 <210> 193
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Nucleic acid sequence

 <400> 193
 gcgtagtatg tacgattacc aatcgg 26

 <210> 194
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Nucleic acid sequence

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 22, 23, 31, 32
 <223> n = A,T,C or G

 <400> 194
 ggtaatcgta catactacgc anngtccgtg nnkggccggt tcaccatctc ccgc 54

 <210> 195
 <211> 53

PB63488FFSeqList (1)

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 195
 tgtgtgtgtg tggcggccgc gctcgagacg gtgaccaggg ttccctgacc cca 53

<210> 196
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 196
 ggtaatcgta catactacgc aaactccgtg cgcggccggt tcaccatctc ccgc 54

<210> 197
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 197
 ttgcaggcgt ggcaacagcg 20

<210> 198
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 198
 cacgacgttg taaaacgacg gcc 23

<210> 199
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 199
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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

PB63488FFSeqList (1)
Ala Lys Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 200
<211> 372
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 200
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcgg tttgactact ggggtcaggg aaccctgggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> 201
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 201
Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Glu Tyr
20 25 30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 202
<211> 372
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 202
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240

PB63488FFSeqList (1)

ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> 203
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 203
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgag aatcacgagta tgggttgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacgt attgatccta agggtagtca tacatactac 180
acagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa tacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagcgt 300
gagttgggta agtcgtatct tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360

<210> 204
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 204
Glu Val Gln Leu Leu 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 Glu Asn Thr
20 25 30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Asp Pro Lys Gly Ser His Thr Tyr Tyr Thr 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 Gln Arg Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 205
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 205
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ctggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat caggatcgga tgtgggtgggt ccgccaggcc 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacgt attgagagtg gtgggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaatcagaat 300
aagtcggggc gttcggggtt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360

PB63488FFSeqList (1)

<210> 206
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

```

<400> 206
Glu Val Gln Leu Leu 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 Asp Gln Asp
 20          25          30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Ala Ile Glu Ser Gly Gly His Arg 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 Asn Gln Asn Lys Ser Gly Arg Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120
  
```

<210> 207
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

```

<400> 207
gagggtgcagc tgttggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcat 300
gcggctgggg tttcgggtac ttattttgac tactggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 366
tcgagc
  
```

<210> 208
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

```

<400> 208
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
 20          25          30
Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35          40          45
Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50          55          60
  
```

PB63488FFSeqList (1)

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	Arg	His	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

<210> 209
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 25, 26, 34, 35, 43, 44, 49, 50, 52, 53, 58, 59
 <223> n = A,T,C or G

<400> 209
 gcggtatatt actgtgcgaa acagnnscgg ggcnnsaagt ggnnsgccnn snnscgcnn 60
 gactactggg gtcagggaac c 81

<210> 210
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 210
 gccagccgg ccatggcgga ggtgcagctg ttggagtctg gg 42

<210> 211
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 211
 gaattcgcgg ccgcctatta gctcgagacg gtgaccaggg 40

<210> 212
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 212
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gaggatagga tgggtgggt ccgccaggct 120
 ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggatcatag gacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300

PB63488FFSeqList (1)

cccggcgaga agtggctcgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctgggc 360
accgtctcga gc 372

<210> 213
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 213
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Leu Ala Arg Gly Arg Leu Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 214
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 214
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Leu Ala Arg Gly Arg Leu Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 215
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

PB63488FFSeqList (1)

<223> Nucleic acid sequence

<400> 215

ggaaccctgg tcaccgtctc gagcgcggcc gcataataag aattca 46

<210> 216

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 216

gcagcctccg gattcacctt tggsacsgag cagatgtggt ggggccgcca ggctccaggg 60

<210> 217

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 217

aagggtctag agtttgtctc acgsattgat tcsccsggtg gscgsacata ctacgcagac 60
tccgtg 66

<210> 218

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 218

gcggtatatt actgtgcgaa acgscatgcs gcsggsgtst csggsacsta ytttgactac 60
tggggtcagg gaacc 75

<210> 219

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 219

gcagcctccg gattcacctt tgatcaggat cgsatgtggt ggggccgcca ggccccaggg 60

<210> 220

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 220

aagggtctag agtgggtctc agcsattgag tcsggsggtc atcgsacata ctacgcagac 60

tccgtg 66

<210> 221
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 221
 accgcggtat attactgtgc gvrkcagaat aagtcsggsc gstcsggstt tgactactgg 60
 ggtcagggg 69

<210> 222
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 222
 gcagcctccg gattcacctt tgagaatacs tcsatgggst ggtccgccca ggctccaggg 60

<210> 223
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 223
 aaggggtctag agtgggtctc acgsattgat ccsaagggtt cscatacata ctacacsgac 60
 tccgtgaagg gccggttcac c 81

<210> 224
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 224
 gcggtatatt actgtgcaa acagcgsgag ctsggsaagt cstaytttga ctactgggggt 60
 caggga 66

<210> 225
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 37, 38
 <223> n = A,T,C or G

PB63488FFSeqList (1)

<400> 225
gcagcctccg gattcacctt tnnknnknnk nnkatgnnkt ggggccgcca ggctccgggg 60
aagggtctc 69

<210> 226
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> 38, 39, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 56, 57
<223> n = A,T,C or G

<400> 226
ccgccaggct ccggggaagg gtctcgagt ggtctcannk attnnknnkn nkggtnnkcg 60
tacatactac gcagactccg 80

<210> 227
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> 47, 48, 50, 51, 53, 54, 56, 57, 59, 60
<223> n = A,T,C or G

<400> 227
ccgccaggct ccggggaagg gtctcgagt ggtctcagcg attgagnnkn nknnknnknn 60
kacatactac gcagactccg 80

<210> 228
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> 25, 26, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38
<223> n = A,T,C or G

<400> 228
accgcggtat attactgtgc gaaannknnk nnknnknnka agtggatggc cgtgggcccgc 60
ttggactact ggggtcaggg 80

<210> 229
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

PB63488FFSeqList (1)

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 47
<223> n = A,T,C or G

<400> 229
accgcggtat attactgtgc gaaacagaag cccnnknnkn nknnknnkgc cgtgggcccgc 60
ttggactact ggggtcaggg                                     80

<210> 230
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> 46, 47, 49, 50, 52, 53, 55, 56, 58, 59
<223> n = A,T,C or G

<400> 230
accgcggtat attactgtgc gaaacagaag cccggccaga agtggnnknn knnknnknnk 60
ttggactact ggggtcaggg                                     80

<210> 231
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 231
ccctggtcac cgtctcgagc taataggcgg ccgcgaattc                                     40

<210> 232
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 232
tatcgtccat ggcggagggtg cagctgttgg agtctgg                                     37

<210> 233
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 233
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtggggag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360

```

tcgagc

<210> 234

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 234

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
 20          25          30
Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35          40          45
Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg 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 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
100          105          110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 235

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 235

```

gagggtgcagc tgttggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttgggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccggcgaga agtgggagcg gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc                                     372

```

<210> 236

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 236

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 20          25          30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50          55          60

```


PB63488FFSeqList (1)

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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 237
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 237
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg accgatcaga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgc attgattccc ccggtgggcg gacatactac 180
gcaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcag 300
ccggcgggggg tgtcggggaa gtacgttgac tactggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagc 366

<210> 238
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

<400> 238
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Asp
20 25 30
Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
35 40 45
Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn 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 Arg Gln Pro Ala Gly Val Ser Gly Lys Tyr Val Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 239
<211> 372
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

<400> 239

PB63488FFSeqList (1)

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttgggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccaatcaga ggtatgttgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

```

<210> 240
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

```

<400> 240
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
20     25     30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35     40     45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ala Pro Asn Gln Arg Tyr Val Ala Arg Gly Arg Leu Asp
100    105    110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115    120

```

<210> 241
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

```

<400> 241
Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1      5      10

```

<210> 242
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

```

<400> 242
Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1      5      10      15
Gly

```

PB63488FFSeqList (1)

<210> 243
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 243
 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 244
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 244
 Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
 1 5 10

<210> 245
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 245
 Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 246
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 246
 Gln Ala Pro Asn Gln Arg Tyr Val Ala Arg Gly Arg Leu Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 247
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 247

PB63488FFSeqList (1)

Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu Gln Met Trp
 1 5 10

<210> 248
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 248
 Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 249
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 249
 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 250
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 250
 Gly Phe Thr Phe Gly Thr Asp Gln Met Trp
 1 5 10

<210> 251
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 251
 Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 252
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 252

Arg Gln Pro Ala Gly Val Ser Gly Lys Tyr Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 253

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 253

gggtctagag tttatttcac gtattgattc gcc 33

<210> 254

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 254

gggaggacat actacgcaaa ctccgtgaag ggccgg 36

<210> 255

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 255

cgcagactcc gtgcgtggcc gggtcacc 28

<210> 256

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 256

gggaggacat actacgcaaa ctccgtgcgt ggccgggttca cc 42

<210> 257

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 257

PB63488FFSeqList (1)

ggacatacta cgcaaactcc gtgaagggcc gg 32

<210> 258
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 258
 cgcagactcc gtgcgtggcc gggttcacc 28

<210> 259
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 259
 ggacatacta cgcaaactcc gtgcgtggcc gggttcacc 38

<210> 260
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 260
 ccctggtcac cgtctcgagc gcgtaataag cggccgcaga tta 43

<210> 261
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 261
 ataaggccat ggcggagggtg cagctgttgg agtctg 36

<210> 262
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 262
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
 gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
 cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcgagcgcg 369

PB63488FFSeqList (1)

<210> 263
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 263
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
 20 25 30
 Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg 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 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 264
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 264
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgttgggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtt tatttcacgt attgattcgc ctgggtgggag gacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
 cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcgagcgcg 369

<210> 265
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 265
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
 20 25 30
 Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Ile
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg 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

PB63488FFSeqList (1)

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90
 Ala Lys Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 266
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 266
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
 gcaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
 cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggtc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcgagcgcg 369

<210> 267
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 267
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
 20 25 30
 Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn 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 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 268
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 268
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120

PB63488FFSeqList (1)

```
ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
gcagactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagcgcg
```

<210> 269

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 269

```
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
 20          25          30
Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35          40          45
Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50          55          60
Arg 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 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
100          105          110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115          120
```

<210> 270

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 270

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtgggtggg ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
gcaaaactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagcgcg
```

<210> 271

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 271

```
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
 20          25          30
```

PB63488FFSeqList (1)

Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val
	35						40					45			
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val
	50					55					60				
Arg	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	Arg	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
		115					120								

<210> 272
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 272

gaggtgcagc	tggttgagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatc	cacctttacg	gagtatagga	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccggggaagg	gtctcgagtg	ggtctcagcg	attgagccga	ttgggtcatag	gacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgcg	tgccgaggat	accgcggtat	attactgtgc	gaaacaggcg	300
cccggcgaga	agtgggcgag	gcggtgggat	ttggactact	ggggtcaggg	aaccctggtc	360
accgtctcga	gcgcg					375

<210> 273
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 273

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	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	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Trp	Ala	Arg	Arg	Trp	Asp	Leu	Asp
		100					105					110			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala			
		115				120						125			

<210> 274
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

PB63488FFSeqList (1)

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 274

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttgggtcatag gacatactac 180
gcaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccggcgaga agtggggcgag gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg
```

<210> 275

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 275

```
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 20          25          30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp
100          105          110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115          120          125
```

<210> 276

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 276

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttgggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccggcgaga agtggggcgag gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg
```

<210> 277

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

PB63488FFSeqList (1)

<400> 277

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 20      25      30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50      55      60
Arg 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp
100      105      110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115      120      125

```

<210> 278

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 278

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcatag gacatactac 180
gcaaactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccggcgaga agtgggcgag gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg                                     375

```

<210> 279

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 279

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 20      25      30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50      55      60
Arg 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp
100      105      110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115      120      125

```

PB63488FFSeqList (1)

<210> 280
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

```

<400> 280
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg gatttcagcg attgagccga ttgggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccggcgaga agtgggagcg gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg                                     375
  
```

<210> 281
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

```

<400> 281
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 20          25          30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35          40          45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp
100          105          110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115          120          125
  
```

<210> 282
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

```

<400> 282
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttgggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccaatcaga ggtatgttgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg                                     375
  
```

<210> 283

PB63488FFSeqList (1)

<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

```

<400> 283
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
          20          25          30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ala Pro Asn Gln Arg Tyr Val Ala Arg Gly Arg Leu Asp
          100          105          110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
          115          120          125

```

<210> 284
<211> 375
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid sequence

```

<400> 284
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcatag gacatactac 180
gcaaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccaatcaga ggtatgttgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg                                     375

```

<210> 285
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence

```

<400> 285
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
          20          25          30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn 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

```

PB63488FFSeqList (1)

			85					90				95			
Ala	Lys	Gln	Ala	Pro	Asn	Gln	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala			
		115					120					125			

<210> 286
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 286
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggatcatag gacatactac 180
 gcaaaactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
 cccaatcaga ggtatgttgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
 accgtctcga gcgcg 375

<210> 287
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence

<400> 287
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Arg 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 Gln Ala Pro Asn Gln Arg Tyr Val Ala Arg Gly Arg Leu Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

<210> 288
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic acid sequence

<400> 288
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtt tatttcacgt attgattcgc ctgggtgggag gacatactac 180

PB63488FFSeqList (1)

gcaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
 cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcgagcgcg 369

<210> 289

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 289

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Thr	Glu
			20					25					30		
Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Ile
		35				40						45			
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	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	Arg	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
		115					120								

<210> 290

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid sequence

<400> 290

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtt tatttcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
 gcaaactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
 cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcgagcgcg 369

<210> 291

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence

<400> 291

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Thr	Glu
			20					25					30		
Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Ile

PB63488FFSeqList (1)

		35				40				45					
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val
	50					55				60					
Arg	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	Arg	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
		115					120								

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: GLAXO GROUP LIMITED

BEATON, Andrew
DIMECH, Caroline
ERTL, Peter F.
FORD, Susannah
MCADAM, Ruth

<120> Título de la invención: LIGANDOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR II DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-BETA

<130> Número de referencia: PB64388

<150> Número de solicitud previa: 61/430,235

<151> Fecha de presentación de la solicitud previa: 2011-01-06

<160> Números de secuencias: 291

<170> Software: FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> SEQ ID NO: 1

<211> Longitud: 119

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 1

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Glu	Gly
			20					25					30		
Thr	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Leu	Ala	Ala	Gly	Ser	Asn	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	Lys	Arg	Gln	Glu	Arg	Asp	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> SEQ ID NO: 2

<211> Longitud: 119

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 2

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ala	Gly	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40						45				
Ser	Ala	Ile	Asn	Arg	Asp	Gly	Thr	Arg	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	His	Asp	Asp	Gly	His	Gly	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115													

<210> SEQ ID NO: 3

<211> Longitud: 120

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 3

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Asp	Asp	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40						45				
Ser	Ala	Ile	Gln	Pro	Asp	Gly	His	Thr	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	Glu	Gln	Asp	Val	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115				120									

<210> SEQ ID NO: 4

<211> Longitud: 119

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 4

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ala	Glu	Asp	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40						45				
Ser	Ala	Ile	Asp	Pro	Gln	Gly	Gln	His	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	Gln	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Thr	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
		100					105						110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115														

<210> SEQ ID NO: 5

<211> Longitud: 124

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 5

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Met	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40						45				
Ser	Ala	Ile	Ser	Pro	Ser	Gly	Ser	Asp	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	Gln	Val	Val	Glu	Tyr	Ser	Arg	Thr	His	Lys	Gly	Val	Phe	Asp	
		100					105						110			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120									

<210> SEQ ID NO: 6

<211> Longitud: 122

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 6

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Phe	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Glu	Gly	Tyr	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40						45				
Ser	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	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	Gln	Gly	Leu	Thr	His	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Phe	Asp	Tyr	Trp	
			100				105						110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115				120										

<210> SEQ ID NO: 7

<211> Longitud: 116

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 7

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Glu	Ala	Tyr	
			20					25					30			
Lys	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40						45				
Ser	Tyr	Ile	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly	Gln	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	Tyr	Gly	Ser	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100				105						110			
Thr	Val	Ser	Ser													
		115														

<210> SEQ ID NO: 8

<211> Longitud: 119

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 8

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Asp	Gly	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	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	Gln	Ala	Ser	Arg	Asn	Ser	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115													

<210> SEQ ID NO: 9

<211> Longitud: 120

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 9

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asp	Asp	Ser	
			20					25					30			
Glu	Met	Ala	Trp	Ala	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				
Ser	Leu	Ile	Arg	Arg	Asn	Gly	Asn	Ala	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	Val	Thr	Lys	Asp	Arg	Ser	Val	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115				120									

<210> SEQ ID NO: 10

<211> Longitud: 120

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 10

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asp	Gln	Asp	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Glu	Ser	Gly	Gly	His	Arg	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	Gln	Asn	Glu	Ser	Gly	Arg	Ser	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115				120									

<210> SEQ ID NO: 11

<211> Longitud: 119

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 11

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asp	Ala	Ala	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Ala	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Ala	Asp	Ile	Gly	Asn	Thr	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	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Asp	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115													

<210> SEQ ID NO: 12

<211> Longitud: 121

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 12

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ala	Gln	Asp	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	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	Gln	Asp	Leu	His	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
			100					105					110			
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120									

<210> SEQ ID NO: 13

<211> Longitud: 120

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 13

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Glu	Asn	Thr	
			20					25					30			
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Arg	Ile	Asp	Pro	Lys	Gly	Ser	His	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	Gln	Arg	Glu	Leu	Gly	Lys	Ser	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115					120									

<210> SEQ ID NO: 14

<211> Longitud: 119

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 14

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Arg	Ser	Tyr
			20					25					30		
Glu	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Lys	Ile	Asp	Pro	Ser	Gly	Arg	Phe	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	Gly	Arg	Thr	Asp	Leu	Gln	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> SEQ ID NO: 15
 <211> Longitud: 121
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 15

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asn	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Arg	Trp	Ala	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Tyr	Ile	Thr	Pro	Lys	Gly	Asp	His	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	Glu	Ser	Leu	His	Asn	Glu	Arg	Val	Lys	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120							

<210> SEQ ID NO: 16
 <211> Longitud: 121
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 16

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Val	Ile	Asp	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	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	Gln	Gln	Ala	Gly	Ser	Ala	Met	Gly	Glu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
		100					105						110			
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120									

<210> SEQ ID NO: 17

<211> Longitud: 116

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 17

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Val	Asn	Tyr	
		20						25				30				
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Lys	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	His	Gly	Leu	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
		100					105						110			
Thr	Val	Ser	Ser													
		115														

<210> SEQ ID NO: 18

<211> Longitud: 116

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 18

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asn	Asp	Met
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Val	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Asn	Arg	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	Gly	Leu	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> SEQ ID NO: 19
 <211> Longitud: 123
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 19

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Thr	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Trp	Ile	Glu	Lys	Thr	Gly	Asn	Lys	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	Ala	Gly	Arg	His	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Arg	Asp	Phe	Asp	Tyr
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			115					120							

<210> SEQ ID NO: 20
 <211> Longitud: 123
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 20

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Lys	Arg	Tyr

			20					25					30				
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	Val	Ile	Asn	Asp	Leu	Gly	Ser	Leu	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	Gly	Asn	Ile	Ser	Met	Val	Arg	Pro	Gly	Ser	Trp	Phe	Asp	Tyr		
			100					105					110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120										

<210> SEQ ID NO: 21
 <211> Longitud: 123
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 21

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Phe	Glu	Tyr		
		20					25					30					
Pro	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
	35					40					45						
Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gln	Arg	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	Ser	His	Thr	Gly	Thr	Val	Arg	His	Leu	Glu	Thr	Phe	Asp	Tyr		
			100				105						110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120										

<210> SEQ ID NO: 22
 <211> Longitud: 120
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 22

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Gln	Glu		
		20					25					30					

Ser	Met	Tyr	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	Ser	Gly	Thr	Arg	Ile	Lys	Gln	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
	115						120								

<210> SEQ ID NO: 23

<211> Longitud: 123

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 23

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Met	Asp	Tyr
		20						25					30		
Arg	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Thr	Gly	Leu	Arg	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	Ile	Lys	Trp	Gly	Glu	Met	Gly	Ser	Tyr	Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
	115						120								

<210> SEQ ID NO: 24

<211> Longitud: 124

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 24

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Met	Asp	Tyr
		20						25					30		
Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val

		35					40					45					
Ser	Met	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Gly	Lys	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	Ala	Arg	Val	Pro	Tyr	Arg	Arg	Gly	His	Arg	Asp	Asn	Phe	Asp		
			100					105					110				
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120										

<210> SEQ ID NO: 25
 <211> Longitud: 120
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 25

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Glu	Pro	Val		
			20					25					30				
Ile	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35				40						45					
Ser	Ala	Ile	Glu	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	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	Pro	Gly	Arg	His	Leu	Ser	Gln	Asp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115					120										

<210> SEQ ID NO: 26
 <211> Longitud: 119
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 26

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asp	Arg	Tyr		
			20					25					30				
Arg	Met	Met	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35				40						45					

Ser	Thr	Ile	Asp	Pro	Ala	Gly	Met	Leu	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	Arg	Leu	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> SEQ ID NO: 27
 <211> Longitud: 119
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 27

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Glu	Tyr
			20					25					30		
Asp	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Asp	Gly	Val	Arg	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	Arg	Ala	Lys	Asn	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> SEQ ID NO: 28
 <211> Longitud: 119
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 28

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Asp	Lys	Tyr
			20					25					30		
Lys	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Leu	Ile	Phe	Pro	Asn	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	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 Tyr Ser Gly	Gln Gly Arg Asp Phe Asp Tyr Trp	Gly Gln Gly		
	100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val	Ser Ser			
115				

<210> SEQ ID NO: 29
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 29

Glu Val Gln Leu Leu	Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly Gly
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser	Cys Ala Ala Ser Gly	Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
	20	25
Arg Met Trp Trp Val	Arg Gln Ala Pro Gly	Lys Gly Leu Glu Trp Val
	35	40
Ser Ala Ile Glu Pro	Ile Gly Asn Arg Thr Tyr	Tyr Ala Asp Ser Val
	50	55
Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Asn Ser	Lys Asn Thr Leu Tyr
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys
	85	90
Ala Lys Gln Met Pro	Gly Arg Lys Trp Thr	Ala Lys Phe Arg Trp Asp
	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Ile Val Ser Ser	
115	120	

<210> SEQ ID NO: 30
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 30

Glu Val Gln Leu Leu	Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly Gly
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser	Cys Ala Ala Ser Gly	Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
	20	25
Arg Met Trp Trp Val	Arg Gln Ala Pro Gly	Lys Gly Leu Glu Trp Val
	35	40
Ser Ala Ile Glu Pro	Ile Gly Asn Arg 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	Gln	Met	Pro	Gly	Gln	Lys	Trp	Met	Ala	Lys	Ser	Arg	Phe	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 31
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 31

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Gln	Lys	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	Gln	Ile	Pro	Gly	Arg	Lys	Trp	Thr	Ala	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 32
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 32

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	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	Gln	Ile	Pro	Gly	Arg	Lys	Trp	Thr	Ala	Asn	Gly	Arg	Lys	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 33
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 33

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	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	Gln	Ile	Pro	Gly	Arg	Lys	Trp	Thr	Ala	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp
		100						105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 34
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 34

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	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	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Arg	Trp	Thr	Gly	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp
		100						105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 35
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 35

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Glu	Tyr
		20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	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	Gln	Phe	Pro	Gly	Arg	Lys	Trp	Thr	Ala	Asn	Ser	Arg	Ser	Asp
		100					105						110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 36
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 36

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Glu	Tyr
		20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	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	Gln	Ile	Pro	Gly	Arg	Lys	Gly	Thr	Ala	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp		
			100					105					110				
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120										

<210> SEQ ID NO: 37
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 37

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Glu	Tyr		
			20					25					30				
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Ser	Val		
	50					55					60						
Asp	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	Gln	Met	Pro	Gly	Gln	Lys	Trp	Met	Ala	Lys	Ser	Arg	Phe	Asp		
			100					105					110				
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120										

<210> SEQ ID NO: 38
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 38

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Glu	Tyr		
			20					25					30				
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Ser	Val		
	50					55					60						
Phe	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	Gln	Met	Pro	Gly	Gln	Lys	Trp	Met	Ala	Lys	Ser	Arg	Phe	Asp
		100						105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 39
 <211> Longitud: 357
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 39
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagt gaggggacga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagtg ggtctcagct attttggctg ctggttctaa tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccgcgcaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaaagagg 300
 caggagcggg atgggtttga ctactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> SEQ ID NO: 40
 <211> Longitud: 357
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 40
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagt gctgggcgga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagtg ggtctcagcg attaatcggg atggtactag gacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacatgat 300
 gatggtcag gtaattttga ctactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> SEQ ID NO: 41
 <211> Longitud: 360
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 41
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gatgatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagtg ggtctcagct attcagcctg atggtcatac gacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccgcgcaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc ggaacaggat 300
 gtaaggggt cgtcttcggt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360

<210> SEQ ID NO: 42
<211> Longitud: 357
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 42
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg gaggatcgga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagct attgatcctc agggtcagca tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagtct 300
actgggtctg ctactgtctga ctactggggt caggggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> SEQ ID NO: 43
<211> Longitud: 372
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 43
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttatg agttatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagct atttctccga gtggtagtga tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagggtg 300
gtggagtatt cgcgtactca taaggggtgtg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> SEQ ID NO: 44
<211> Longitud: 366
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 44
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtt cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgag gggatatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagct attgattctc tgggtgatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagtctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagggg 300
cttacgcata agtctccgag tacttttgac tactgggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagc 366

<210> SEQ ID NO: 45
<211> Longitud: 348
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 45

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggaggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgag gcgtataaga tgacgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctggagtg ggtctcatat attacgccgt ctgggtgggtca gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaatatggg 300
tcgagttttg actactgggg tcaggggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> SEQ ID NO: 46

<211> Longitud: 357

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 46

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg gatggtcgta tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagct attgaggggg cgggttcgga tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
tcgcggaatt cgccgtttga ctactggggg caggggaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> SEQ ID NO: 47

<211> Longitud: 360

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 47

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat gatagtgaga tggcgtgggc ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcactt attcggcgta atggtaatgc tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagttacg 300
aaggatcggt ctgtgctttt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360
```

<210> SEQ ID NO: 48

<211> Longitud: 360

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 48

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat caggatcgga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
```

```
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagct attgagagtg gtgggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagaat 300
gagtcggggc gttcggggtt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360
```

<210> SEQ ID NO: 49
<211> Longitud: 357
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artifificla Sequence

```
<400> Secuencia: 49
gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat gcggttagga tgtggtgggc ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagcg attgcggata ttggtataac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagtct 300
ggttcggagg atcattttga ctactggggt caggggaacc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> SEQ ID NO: 50
<211> Longitud: 363
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

```
<400> Secuencia: 50
gaggtgcagc tggttgagtc cgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgct caggatcgga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacaggat 300
ttgcatggta ctagttcttt gtttgactac tggggtcagg gaacctggt caccgtctcg 360
agc
```

<210> SEQ ID NO: 51
<211> Longitud: 360
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

```
<400> Secuencia: 51
gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgag aatacgagta tgggttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcacgt attgatacta agggtagtca tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa tacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagcgt 300
gagttgggta agtcgcattt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360
```

<210> SEQ ID NO: 52
<211> Longitud: 357

<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 52
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttcgt agttatgaga tgacttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaaag attgatcctt cgggtcgttt tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaaggtcgg 300
acggatcttc agctttttga ctactggggt caggggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> SEQ ID NO: 53
<211> Longitud: 363
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 53
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg aattattgga tgccggtgggc ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcatat attactccta aggggtgatca tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc ggaatcgctt 300
cataatgagc gtgttaagca ttttgactac tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 360
agc 363

<210> SEQ ID NO: 54
<211> Longitud: 363
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 54
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttact agttatcgta tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagtt attgattcta ctgggttcggc tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagcag 300
gctgggagtg cgatggggga gtttgactac tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 360
agc 363

<210> SEQ ID NO: 55
<211> Longitud: 348
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 55

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aattatcgta tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgataa gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacatggg 300
ctgtcgtttg actactgggg tcaggggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> SEQ ID NO: 56

<211> Longitud: 348

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 56

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaat gatatgagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagtg attaatgctg atggtaatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagatggg 300
ctgccttttg actactgggg tcaggggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> SEQ ID NO: 57

<211> Longitud: 369

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 57

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg acttatggta tgggttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcatgg attgagaaga cgggtaataa gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagcgggg 300
aggcatatta aggtgcgttc gagggatttt gactactggg gtcagggaac cctggtcacc 360
gtctcgagc 369
```

<210> SEQ ID NO: 58

<211> Longitud: 369

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 58

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag aggtattcta tgggttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagtt attaatgac tgggtagttt gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
```

ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaggggaat 300
attagtatgg tgaggccggg gagttggttt gactactggg gtcagggaac cctggtcacc 360
gtctcgagc 369

<210> SEQ ID NO: 59
<211> Longitud: 369
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 59
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttt gagtatccta tgggttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagtt attagtggg atggtcagcg gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaagtcac 300
acggggactg tgaggcatct ggagacgttt gactactggg gtcagggaac cctggtcacc 360
gtctcgagc 369

<210> SEQ ID NO: 60
<211> Longitud: 360
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 60
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg caggagagta tgtattgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaagtgg 300
acgcggatta agcagggttt tgactactgg ggtcaggga ccctggtcac cgtctcgagc 360

<210> SEQ ID NO: 61
<211> Longitud: 369
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 61
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttatg gattatagga tgtattgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaggg attgatacta ctggtttgcg gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaattaag 300
tggggggaga tggggagtta taagactttt gactactggg gtcagggaac cctggtcacc 360
gtctcgagc 369

<210> SEQ ID NO: 62
<211> Longitud: 372
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 62
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttatg gattatgata tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaatg attcgtgagg atgggtggtaa gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagcgagg 300
gtgccttata ggcgtgggca tagggataat tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> SEQ ID NO: 63
<211> Longitud: 360
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 63
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cttccggatt cacctttgag cgggttatta tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagct attgaggcgc ggggtggggg gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacctggg 300
cggcatctta gtcaggattt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360

<210> SEQ ID NO: 64
<211> Longitud: 357
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 64
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat cggatcgtta tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg attgatcctg ctggtatgct tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaaggctg 300
gcttcgcgga gtcattttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> SEQ ID NO: 65
<211> Longitud: 357
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 65

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgctgcag cctccggatt caccttttct gagtatgata tggcttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtcttgagtg ggtctcacgg attcgttctg atgggtgttag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcgt 300
gctaagaatg gttggtttga ctactggggt caggggaacc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> SEQ ID NO: 66

<211> Longitud: 357

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 66

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtataaga tggcttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctggagtg ggtctcactt atttttccga atgggtgttcc tacatactac 180
gcaaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaatatag 300
ggtcaggggc gggattttga ctactggggt caggggaacc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> SEQ ID NO: 67

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 67

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacc gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatg 300
ccgggccgga agtggacggc caagttccgc tgggactact ggggtcaggg aaccctgggtc 360
atcgtctcga gc 372
```

<210> SEQ ID NO: 68

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 68

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
```

```

ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatg 300
cccggccaga agtggatggc caagtcccg ttcgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

```

<210> SEQ ID NO: 69

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 69

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcagaa gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcgg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
atcgtctcga gc 372

```

<210> SEQ ID NO: 70

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 70

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taatggctgt aaggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

```

<210> SEQ ID NO: 71

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 71

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcatac gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcgg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360

```

accgtctcga gc

372

<210> SEQ ID NO: 72

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 72

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcagc ggtggactgg taattcgcgg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372
```

<210> SEQ ID NO: 73

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 73

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcgg tctgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372
```

<210> SEQ ID NO: 74

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 74

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agggaactgc taattcgcgg tttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372
```

<210> SEQ ID NO: 75

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 75
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcacgctccg tggacggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatg 300
cccggccaga agtggatggc caagtcccgc ttcgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> SEQ ID NO: 76
<211> Longitud: 372
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 76
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtgggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcacgctccg tgttcggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatg 300
cccggccaga agtggatggc caagtcccgc ttcgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> SEQ ID NO: 77
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 77
Ser Glu Gly Thr Met Trp
1 5

<210> SEQ ID NO: 78
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 78
Ser Ala Gly Arg Met Trp

1

5

<210> SEQ ID NO: 79
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 79
Thr Asp Asp Arg Met Trp
1 5

<210> SEQ ID NO: 80
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 80
Ala Glu Asp Arg Met Trp
1 5

<210> SEQ ID NO: 81
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 81
Met Ser Tyr Arg Met Trp
1 5

<210> SEQ ID NO: 82
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 82
Glu Gly Tyr Arg Met Trp
1 5

<210> SEQ ID NO: 83
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 83
Glu Ala Tyr Lys Met Thr
1 5

<210> SEQ ID NO: 84
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 84
Gly Asp Gly Arg Met Trp
1 5

<210> SEQ ID NO: 85
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 85
Asp Asp Ser Glu Met Ala
1 5

<210> SEQ ID NO: 86
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 86
Asp Gln Asp Arg Met Trp
1 5

<210> SEQ ID NO: 87
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 87

Asp Ala Ala Arg Met Trp

1 5

<210> SEQ ID NO: 88

<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 88

Ala Gln Asp Arg Met Trp

1 5

<210> SEQ ID NO: 89

<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 89

Glu Asn Thr Ser Met Gly

1 5

<210> SEQ ID NO: 90

<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 90

Arg Ser Tyr Glu Met Thr

1 5

<210> SEQ ID NO: 91

<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 91

Ser Asn Tyr Trp Met Arg

1 5

<210> SEQ ID NO: 92

<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 92

Thr Ser Tyr Arg Met Trp

1 5

<210> SEQ ID NO: 93

<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 93

Val Asn Tyr Arg Met Trp

1 5

<210> SEQ ID NO: 94

<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 94

Asn Asp Met Arg Met Trp

1 5

<210> SEQ ID NO: 95

<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 95

Thr Thr Tyr Gly Met Gly
1 5

<210> SEQ ID NO: 96
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 96
Lys Arg Tyr Ser Met Gly
1 5

<210> SEQ ID NO: 97
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 97
Phe Glu Tyr Pro Met Gly
1 5

<210> SEQ ID NO: 98
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 98
Gly Gln Glu Ser Met Tyr
1 5

<210> SEQ ID NO: 99
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 99
Met Asp Tyr Arg Met Tyr
1 5

<210> SEQ ID NO: 100
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 100
Met Asp Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> SEQ ID NO: 101
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 101
Glu Pro Val Ile Met Gly
1 5

<210> SEQ ID NO: 102
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 102
Asp Arg Tyr Arg Met Met
1 5

<210> SEQ ID NO: 103
<211> Longitud: 6
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 103
Ser Glu Tyr Asp Met Ala
1 5

<210> SEQ ID NO: 104
<211> Longitud: 6

<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 104
Asp Lys Tyr Lys Met Ala
1 5

<210> SEQ ID NO: 105
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 105
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 106
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 106
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 107
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 107
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 108
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 108
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 109
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 109
Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 110
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 110
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 111
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 111
Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 112
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 112

Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 113

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 113

Ala Ile Leu Ala Ala Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 114

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 114

Ala Ile Asn Arg Asp Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 115

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 115

Ala Ile Gln Pro Asp Gly His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 116

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 116

Ala	Ile	Asp	Pro	Gln	Gly	Gln	His	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 117

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 117

Ala	Ile	Ser	Pro	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 118

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 118

Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 119

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 119

Tyr	Ile	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 120
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 120
Ala Ile Glu Gly Ala Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 121
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 121
Leu Ile Arg Arg Asn Gly Asn Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 122
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 122
Ala Ile Glu Ser Gly Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 123
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 123

Ala Ile Ala Asp Ile Gly Asn Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 124
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 124
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 125
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 125
Arg Ile Asp Pro Lys Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 126
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 126
Lys Ile Asp Pro Ser Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 127
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 127

Tyr	Ile	Thr	Pro	Lys	Gly	Asp	His	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 128

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 128

Val	Ile	Asp	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 129

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 129

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 130

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 130

Val	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Asn	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 131
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 131
Trp Ile Glu Lys Thr Gly Asn Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 132
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 132
Val Ile Asn Asp Leu Gly Ser Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 133
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 133
Val Ile Ser Gly Asp Gly Gln Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 134
<211> Longitud: 18
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 134

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly Arg

<210> SEQ ID NO: 135
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 135
Gly Ile Asp Pro Thr Gly Leu Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 136
<211> Longitud: 18
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 136
Met Ile Arg Glu Asp Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly Arg

<210> SEQ ID NO: 137
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 137
Ala Ile Glu Ala Arg Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 138
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 138

Thr	Ile	Asp	Pro	Ala	Gly	Met	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 139

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 139

Arg	Ile	Arg	Ser	Asp	Gly	Val	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 140

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 140

Leu	Ile	Phe	Pro	Asn	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 141

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 141

Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> SEQ ID NO: 142
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 142
Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 143
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 143
Ala Ile Glu Pro Ile Gly Gln Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 144
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 144
Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 145
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 145

Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 146
<211> Longitud: 18
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 146
Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

<210> SEQ ID NO: 147
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 147
Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 148
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 148
Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 149
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 149
Lys Arg Gln Glu Arg Asp Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 150
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 150
His Asp Asp Gly His Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 151
<211> Longitud: 12
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 151
Glu Gln Asp Val Lys Gly Ser Ser Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 152
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 152
Gln Ser Thr Gly Ser Ala Thr Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 153
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 153

Gln	Val	Val	Glu	Tyr	Ser	Arg	Thr	His	Lys	Gly	Val	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 154

<211> Longitud: 13

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 154

Gln	Gly	Leu	Thr	His	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10			

<210> SEQ ID NO: 155

<211> Longitud: 7

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 155

Tyr	Gly	Ser	Ser	Phe	Asp	Tyr
1				5		

<210> SEQ ID NO: 156

<211> Longitud: 10

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 156

Gln	Ala	Ser	Arg	Asn	Ser	Pro	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

<210> SEQ ID NO: 157

<211> Longitud: 11

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 157

Val Thr Lys Asp Arg Ser Val Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> SEQ ID NO: 158
<211> Longitud: 11
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 158
Gln Asn Glu Ser Gly Arg Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 159
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 159
Gln Ser Gly Ser Glu Asp His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 160
<211> Longitud: 12
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 160
Gln Asp Leu His Gly Thr Ser Ser Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 161
<211> Longitud: 11
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 161
Gln Arg Glu Leu Gly Lys Ser His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 162
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 162
Gly Arg Thr Asp Leu Gln Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 163
<211> Longitud: 12
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 163
Ser Leu His Asn Glu Arg Val Lys His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 164
<211> Longitud: 12
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 164
Gln Gln Ala Gly Ser Ala Met Gly Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 165
<211> Longitud: 7
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 165
His Gly Leu Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> SEQ ID NO: 166
<211> Longitud: 7
<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 166

Asp Gly Leu Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> SEQ ID NO: 167

<211> Longitud: 14

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 167

Ala Gly Arg His Ile Lys Val Arg Ser Arg Asp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> SEQ ID NO: 168

<211> Longitud: 14

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 168

Gly Asn Ile Ser Met Val Arg Pro Gly Ser Trp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> SEQ ID NO: 169

<211> Longitud: 14

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 169

Ser His Thr Gly Thr Val Arg His Leu Glu Thr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> SEQ ID NO: 170

<211> Longitud: 11

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 170

Ser	Gly	Thr	Arg	Ile	Lys	Gln	Gly	Phe	Asp	Tyr
1				5					10	

<210> SEQ ID NO: 171

<211> Longitud: 14

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 171

Ile	Lys	Trp	Gly	Glu	Met	Gly	Ser	Tyr	Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10				

<210> SEQ ID NO: 172

<211> Longitud: 15

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 172

Ala	Arg	Val	Pro	Tyr	Arg	Arg	Gly	His	Arg	Asp	Asn	Phe	Asp	Tyr
1				5				10					15	

<210> SEQ ID NO: 173

<211> Longitud: 11

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 173

Pro	Gly	Arg	His	Leu	Ser	Gln	Asp	Phe	Asp	Tyr
1				5					10	

<210> SEQ ID NO: 174

<211> Longitud: 10

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 174

Arg Leu Ala Ser Arg Ser His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 175
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 175
Asp Arg Ala Lys Asn Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 176
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 176
Tyr Ser Gly Gln Gly Arg Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 177
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 177
Gln Met Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Lys Phe Arg Trp Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 178
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 178
Gln Met Pro Gly Gln Lys Trp Met Ala Lys Ser Arg Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 179
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 179
Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 180
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 180
Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Gly Arg Lys Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 181
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 181
Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 182
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 182
Gln Ile Pro Gly Gln Arg Trp Thr Gly Asn Ser Arg Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 183
<211> Longitud: 15

<212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 183
 Gln Phe Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Ser Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 184
 <211> Longitud: 15
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 184
 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Gly Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 185
 <211> Longitud: 24
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 185
 agcggataac aatttcacac agga 24

<210> SEQ ID NO: 186
 <211> Longitud: 24
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 186
 cgccagggtt ttcccagtca cgac 24

<210> SEQ ID NO: 187
 <211> Longitud: 20
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 187

ttgcaggcgt ggcaacagcg 20

<210> SEQ ID NO: 188
 <211> Longitud: 23
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 188
 cacgacgttg taaaacgacg gcc 23

<210> SEQ ID NO: 189
 <211> Longitud: 60
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 189
 gcagcctcgc gattcacctt tacsgastat agsatgtgst gggctccgcca ggctccgggg 60

<210> SEQ ID NO: 190
 <211> Longitud: 64
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 190
 ggggtctcgag tgggtctcag csattgascc satsggsaas cgsacatact acgcagactc 60
 cgtg 64

<210> SEQ ID NO: 191
 <211> Longitud: 77
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 191
 gcggtatatt actgtgcgaa acasatsccs ggscgsaast gsacsgcsaa stcscgstts 60
 gactactggg gtcaggg 77

<210> SEQ ID NO: 192
 <211> Longitud: 44
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 192
 ttgcaggcgt ggcaacagcg tcgacagagg tgcagctggt ggag 44

<210> SEQ ID NO: 193
 <211> Longitud: 26
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 193
 gcgtagtatg tacgattacc aatcgg 26

<210> SEQ ID NO: 194
 <211> Longitud: 54
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<220> Característica:
 <221> misc_feature
 <222> 22, 23, 31, 32
 <223> Otra Información: n = A,T,C or G

<400> Secuencia: 194
 ggtaatcgta catactacgc anngtcggtg nnkggccggt tcaccatctc ccgc 54

<210> SEQ ID NO: 195
 <211> Longitud: 53
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 195
 tgtgtgtgtg tggcggccgc gctcgagacg gtgaccaggg ttccctgacc cca 53

<210> SEQ ID NO: 196
 <211> Longitud: 54
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 196
 ggtaatcgta catactacgc aaactccgtg cgcggccggt tcaccatctc ccgc 54

<210> SEQ ID NO: 197

<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 197
ttgcaggcgt ggcaacagcg

20

<210> SEQ ID NO: 198
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 198
cacgacgttg taaaacgacg gcc

23

<210> SEQ ID NO: 199
<211> Longitud: 124
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 199
Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Glu Tyr
20 25 30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 200
<211> Longitud: 372
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 200

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagt ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcgg ttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372
```

<210> SEQ ID NO: 201

<211> Longitud: 124

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 201

```
Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Glu Tyr
 20          25          30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly Asn Arg 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 Gln Ile Pro Gly Arg Lys Trp Thr Ala Asn Ser Arg Phe Asp
100          105          110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120
```

<210> SEQ ID NO: 202

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 202

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagt ggtctcagcg attgagccga ttggtaatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagatt 300
ccggggcgta agtggactgc taattcgcgg ttgactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372
```

<210> SEQ ID NO: 203

<211> Longitud: 360
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 203
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgag aatacgagta tgggttgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacgt attgataccta agggtagtca tacatactac 180
acagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa tacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagcgt 300
gagttgggta agtcgtattt tgactactgg ggtcaggga cctggtcac cgtctcgagc 360

<210> SEQ ID NO: 204
<211> Longitud: 120
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 204
Glu Val Gln Leu Leu 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 Glu Asn Thr
20 25 30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Asp Pro Lys Gly Ser His Thr Tyr Tyr Thr 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 Gln Arg Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 205
<211> Longitud: 360
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 205
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ctggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat caggatcgga tgtggtgggt ccgccaggcc 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcagct attgagagtg gtggcatag gacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaatcagaat 300
 aagtcggggc gttcgggttt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360

<210> SEQ ID NO: 206
 <211> Longitud: 120
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial
 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 206
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Asp Gln Asp
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Ser Gly Gly His Arg 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 Asn Gln Asn Lys Ser Gly Arg Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO: 207
 <211> Longitud: 366
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial
 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 207
 gaggtgcagc tgttgaggatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcat 300
 gcggctgggg tttcgggtac ttattttgac tactgggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcgagc 366

<210> SEQ ID NO: 208
 <211> Longitud: 122
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial
 <220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 208

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Thr	Glu		
			20					25					30				
Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val		
			35				40					45					
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	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	Arg	His	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp		
			100					105					110				
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120											

<210> SEQ ID NO: 209

<211> Longitud: 81

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<220> Característica:

<221> misc_feature

<222> 25, 26, 34, 35, 43, 44, 49, 50, 52, 53, 58, 59

<223> Otra Información: n = A,T,C or G

<400> Secuencia: 209

gcggtatatt	actgtgcgaa	acagnnsccc	ggcnnsaagt	ggnnsgccnn	snnscgcnn	60
gactactggg					gtcaggaac	81

<210> SEQ ID NO: 210

<211> Longitud: 42

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 210

gcccgagccgg	ccatggcgga	ggtgcagctg	ttggagtctg	gg	42
-------------	------------	------------	------------	----	----

<210> SEQ ID NO: 211

<211> Longitud: 40

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 211

gaattcgcgg ccgcctatta gctcgagacg gtgaccaggg

40

<210> SEQ ID NO: 212

<211> Longitud: 372

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 212

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccggcgaga agtggtctgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> SEQ ID NO: 213

<211> Longitud: 124

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 213

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr
		20						25				30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35					40					45				
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	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	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Trp	Leu	Ala	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp
		100					105					110			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
	115					120									

<210> SEQ ID NO: 214

<211> Longitud: 124

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 214

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr		
			20					25					30				
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
			35				40						45				
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	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	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Trp	Leu	Ala	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp		
			100					105					110				
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
			115				120										

<210> SEQ ID NO: 215

<211> Longitud: 46

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 215

ggaaccctgg tcaccgtctc gagcgcggcc gcataataag aattca 46

<210> SEQ ID NO: 216

<211> Longitud: 60

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 216

gcagcctccg gattcacctt tggsacsgag cagatgtggt ggggtccgcc ggctccaggg 60

<210> SEQ ID NO: 217

<211> Longitud: 66

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 217

aagggtctag agtttgtctc acgsattgat tcscsggtg gscgsacata ctacgcagac 60
tccgtg 66

<210> SEQ ID NO: 218
<211> Longitud: 75
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 218
gcggtatatt actgtgcgaa acgscatgcs gcsggsgtst csggsacsta ytttgactac 60
tggggtcagg gaacc 75

<210> SEQ ID NO: 219
<211> Longitud: 60
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Nucliec acid sequence

<400> Secuencia: 219
gcagcctccg gattcacctt tgatcaggat cgsatgtggt ggggccgcca ggccccaggg 60

<210> SEQ ID NO: 220
<211> Longitud: 66
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 220
aagggtctag agtgggtctc agcsattgag tcsggsggtc atcgsacata ctacgcagac 60
tccgtg 66

<210> SEQ ID NO: 221
<211> Longitud: 69
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 221
accgcggtat attactgtgc gvrkcagaat aagtcsggsc gstcsggstt tgactactgg 60
ggtcaggga 69

<210> SEQ ID NO: 222
<211> Longitud: 60
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 222

gcagcctccg gattcacctt tgagaatacs tcsatgggst gggcccgcca ggctccaggg 60

<210> SEQ ID NO: 223

<211> Longitud: 81

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 223

aagggtctag agtgggtctc acgsattgat ccsaagggtt cscatacata ctacacsgac 60
tccgtgaagg gccggttcac c 81

<210> SEQ ID NO: 224

<211> Longitud: 66

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 224

gcggtatatt actgtgcgaa acagcgsag ctsggsaagt cstaytttga ctactggggg 60
cagga 66

<210> SEQ ID NO: 225

<211> Longitud: 69

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<220> Característica:

<221> misc_feature

<222> 22, 23, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 37, 38

<223> Otra Información: n = A,T,C or G

<400> Secuencia: 225

gcagcctccg gattcacctt tnnknnknnk nnkatgnnkt gggcccgcca ggctccgggg 60
aagggtctc 69

<210> SEQ ID NO: 226

<211> Longitud: 80

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<220> Característica:
 <221> misc_feature
 <222> 38, 39, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 56, 57
 <223> Otra Información: n = A,T,C or G

<400> Secuencia: 226
 ccgccaggct ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcannk attnnknnkn nkggtnnkcg 60
 tacatactac gcagactccg 80

<210> SEQ ID NO: 227
 <211> Longitud: 80
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<220> Característica:
 <221> misc_feature
 <222> 47, 48, 50, 51, 53, 54, 56, 57, 59, 60
 <223> Otra Información: n = A,T,C or G

<400> Secuencia: 227
 ccgccaggct ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagnnkn nknnknnknn 60
 kacatactac gcagactccg 80

<210> SEQ ID NO: 228
 <211> Longitud: 80
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<220> Característica:
 <221> misc_feature
 <222> 25, 26, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38
 <223> Otra Información: n = A,T,C or G

<400> Secuencia: 228
 accgcggtat attactgtgc gaaannknnk nnknnknnka agtggatggc cgtggggccgc 60
 ttggactact ggggtcaggg 80

<210> SEQ ID NO: 229
 <211> Longitud: 80
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<220> Característica:
 <221> misc_feature
 <222> 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 47
 <223> Otra Información: n = A,T,C or G

<400> Secuencia: 229
accgcggtat attactgtgc gaaacagaag cccnnknkn nknnknkngc cgtggggccgc 60
ttggactact ggggtcaggg 80

<210> SEQ ID NO: 230
<211> Longitud: 80
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<220> Característica:
<221> misc_feature
<222> 46, 47, 49, 50, 52, 53, 55, 56, 58, 59
<223> Otra Información: n = A,T,C or G

<400> Secuencia: 230
accgcggtat attactgtgc gaaacagaag cccggccaga agtggnnkn knnnknknkn 60
ttggactact ggggtcaggg 80

<210> SEQ ID NO: 231
<211> Longitud: 40
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 231
ccctgggtcac cgtctcgagc taataggcgg ccgcgaattc 40

<210> SEQ ID NO: 232
<211> Longitud: 37
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 232
tatcggtccat ggcggaggtg cagctgttgg agtctgg 37

<210> SEQ ID NO: 233
<211> Longitud: 366
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 233
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccgatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120


```

ccaggggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggc aggggaaccct ggtcacgcgc 360
tcgagc

```

<210> SEQ ID NO: 234
 <211> Longitud: 122
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 234

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Thr	Glu
			20					25					30		
Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val
		35					40					45			
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	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	Arg	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 235
 <211> Longitud: 372
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 235

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccggcgaga agtgggagag gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gc

```

<210> SEQ ID NO: 236
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 236

```
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
          20          25          30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp
          100          105          110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120
```

<210> SEQ ID NO: 237

<211> Longitud: 366

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 237

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg accgatcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgc attgattccc ccggtgggcg gacatactac 180
gcaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcag 300
ccggcggggg tgtcggggaa gtacgttgac tactgggggtc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagc
```

<210> SEQ ID NO: 238

<211> Longitud: 122

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 238

```
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Asp
          20          25          30
Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
          35          40          45
Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn 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 Arg Gln Pro	Ala Gly Val Ser Gly Lys Tyr Val	Asp Tyr Trp		
	100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Leu	Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		

<210> SEQ ID NO: 239
 <211> Longitud: 372
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 239
 gaggtgcagc tgttgagatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggatcatag gacatactac 180
 gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
 cccaatcaga ggtatgttgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
 accgtctcga gc 372

<210> SEQ ID NO: 240
 <211> Longitud: 124
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 240
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ala Pro Asn Gln Arg Tyr Val Ala Arg Gly Arg Leu Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO: 241
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 241
Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 242
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 242
Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 243
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 243
Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 244
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 244
Gly Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Arg Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 245

<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 245
Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 246
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 246
Gln Ala Pro Asn Gln Arg Tyr Val Ala Arg Gly Arg Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 247
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 247
Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu Gln Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 248
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 248
Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 249
<211> Longitud: 13
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 249
Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 250
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 250
Gly Phe Thr Phe Gly Thr Asp Gln Met Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 251
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 251
Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO: 252
<211> Longitud: 13
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 252
Arg Gln Pro Ala Gly Val Ser Gly Lys Tyr Val Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 253

<211> Longitud: 33
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 253
 gggctctagag tttatttcac gtattgattc gcc 33

 <210> SEQ ID NO: 254
 <211> Longitud: 36
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 254
 gggaggacat actacgcaaa ctccgtgaag ggccgg 36

 <210> SEQ ID NO: 255
 <211> Longitud: 28
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 255
 cgcagactcc gtgcgtggcc ggttcacc 28

 <210> SEQ ID NO: 256
 <211> Longitud: 42
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 256
 gggaggacat actacgcaaa ctccgtgcgt ggccggttca cc 42

 <210> SEQ ID NO: 257
 <211> Longitud: 32
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 257
 ggacatacta cgcaaactcc gtgaagggcc gg 32

 <210> SEQ ID NO: 258

<211> Longitud: 28
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 258
 cgcagactcc gtgcgtggcc gggttcacc 28

 <210> SEQ ID NO: 259
 <211> Longitud: 38
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 259
 ggacatacta cgcaaactcc gtgcgtggcc gggttcacc 38

 <210> SEQ ID NO: 260
 <211> Longitud: 43
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 260
 ccctggtcac cgtctcgagc gcgtaataag cggccgcaga tta 43

 <210> SEQ ID NO: 261
 <211> Longitud: 36
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 261
 ataaggccat ggcggagggtg cagctggttg agtctg 36

 <210> SEQ ID NO: 262
 <211> Longitud: 369
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

 <400> Secuencia: 262
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180


```
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagcgcg                                     369
```

<210> SEQ ID NO: 263
 <211> Longitud: 123
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 263

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Thr	Glu
			20					25					30		
Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val
		35					40					45			
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	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	Arg	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 264
 <211> Longitud: 369
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 264

```
gaggtgcagc tgttgaggatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtt tatttcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactggggtc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagcgcg                                     369
```

<210> SEQ ID NO: 265
 <211> Longitud: 123
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 265

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Thr	Glu		
			20					25					30				
Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Ile		
			35				40					45					
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	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	Arg	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Trp		
			100					105					110				
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala							
		115					120										

<210> SEQ ID NO: 266

<211> Longitud: 369

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 266

gaggtgcagc	tgttgagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggc	cctgcgtctc	60
tctgtgcag	cctccggatt	cacctttggg	acggagcaga	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gtctagagtt	tgtctcacgt	attgattcgc	ctggtgggag	gacatactac	180
gcaaactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaata	acagcctgcg	tgccgaggac	accgcgggat	attactgtgc	gaaacggcga	300
cccacggggg	tgtccgggac	gttttatgac	tactgggggc	aggggaaccct	ggtcaccgtc	360
tcgagcgcg						369

<210> SEQ ID NO: 267

<211> Longitud: 123

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 267

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Thr	Glu		
			20					25					30				
Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val		
			35				40					45					
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	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	Arg	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 268
 <211> Longitud: 369
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 268
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctgggtgggag gacatactac 180
 gcagactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
 cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggtc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcgagcgcg 369

<210> SEQ ID NO: 269
 <211> Longitud: 123
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 269
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
 20 25 30
 Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg 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 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> SEQ ID NO: 270

<211> Longitud: 369
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 270
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtt tgtctcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
gcaaaactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggtc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagcgcg 369

<210> SEQ ID NO: 271
<211> Longitud: 123
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 271
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
20 25 30
Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
35 40 45
Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60
Arg 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 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> SEQ ID NO: 272
<211> Longitud: 375
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 272
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcatag gacatactac 180

```
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagggc 300
cccggcgaga agtgggcgag gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg 375
```

<210> SEQ ID NO: 273
 <211> Longitud: 125
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial
 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 273

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	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	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Trp	Ala	Arg	Arg	Trp	Asp	Leu	Asp
			100				105					110			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala			
		115					120					125			

<210> SEQ ID NO: 274
 <211> Longitud: 375
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial
 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 274

```
gaggtgcagc tgttgaggatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcatag gacatactac 180
gcaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagggc 300
cccggcgaga agtgggcgag gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg 375
```

<210> SEQ ID NO: 275
 <211> Longitud: 125
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial
 <220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 275

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	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	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Trp	Ala	Arg	Arg	Trp	Asp	Leu	Asp	
			100					105					110			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala				
		115					120					125				

<210> SEQ ID NO: 276

<211> Longitud: 375

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 276

gaggtgcagc	tgttgagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggc	cctgcgtctc	60
tcctgtgcag	cctccggatc	cacctttacg	gagtatagga	tgtggtgggt	ccgccaggct	120
ccggggaagg	gtctcgagtg	ggtctcagcg	attgagccga	ttggtcatag	gacatactac	180
gcagactccg	tgcgtggccg	gttcaccatc	tcccgcgaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaata	acagcctgcg	tgccgaggat	accgcgggat	attactgtgc	gaaacaggcg	300
cccggcgaga	agtgggcgag	gcggtgggat	ttggactact	ggggtcaggg	aaccctggtc	360
accgtctcga	gcgcg					375

<210> SEQ ID NO: 277

<211> Longitud: 125

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 277

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	
			20					25					30			
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					

Arg	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	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Trp	Ala	Arg	Arg	Trp	Asp	Leu	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala			
		115					120					125			

<210> SEQ ID NO: 278
 <211> Longitud: 375
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 278
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcatag gacatactac 180
 gcaaaactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
 cccggcgaga agtggggcgag gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
 accgtctcga gcgcg 375

<210> SEQ ID NO: 279
 <211> Longitud: 125
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 279
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Arg 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

<210> SEQ ID NO: 280

<211> Longitud: 375
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 280
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg gatttcagcg attgagccga ttggcatag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggcg 300
cccggcgaga agtgggagag gcggtgggat ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg 375

<210> SEQ ID NO: 281
<211> Longitud: 125
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 281
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Arg Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg 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 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

<210> SEQ ID NO: 282
<211> Longitud: 375
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 282
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggcatag gacatactac 180


```
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagggc 300
cccaatcaga ggtatgttgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg 375
```

<210> SEQ ID NO: 283
 <211> Longitud: 125
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial
 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 283

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	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	Gln	Ala	Pro	Asn	Gln	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala			
		115					120					125			

<210> SEQ ID NO: 284
 <211> Longitud: 375
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial
 <220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 284

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatc cacctttacg gagtatagga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccggggaagg gtctcgagtg ggtctcagcg attgagccga ttggtcatag gacatactac 180
gcaaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagggc 300
cccaatcaga ggtatgttgc ccggggccgc ttggactact ggggtcaggg aaccctggtc 360
accgtctcga gcgcg 375
```

<210> SEQ ID NO: 285
 <211> Longitud: 125
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 285

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr		
			20					25					30				
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35				40						45					
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	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	Gln	Ala	Pro	Asn	Gln	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp		
			100					105					110				
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
		115				120						125					

<210> SEQ ID NO: 286

<211> Longitud: 375

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 286

gaggtgcagc	tgttgagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggc	cctgcgtctc	60
tctgtgcag	cctccggatc	cacctttacg	gagtatagga	tgtgggtgggt	ccgccaggct	120
ccggggaagg	gtctcgagtg	ggtctcagcg	attgagccga	ttgggtcatag	gacatactac	180
gcaaactccg	tgcgtggccg	gttcaccatc	tcccgcgcaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaata	acagcctgcg	tgccgaggat	accgcgggat	attactgtgc	gaaacaggcg	300
cccaatcaga	ggtatgttgc	ccggggccgc	ttggactact	ggggtcaggg	aaccctggtc	360
accgtctcga	gcgcg					375

<210> SEQ ID NO: 287

<211> Longitud: 125

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 287

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr		
			20					25					30				
Arg	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35				40						45					
Ser	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	His	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val		
	50					55					60						

Arg	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	Gln	Ala	Pro	Asn	Gln	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp
		100						105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala			
		115					120					125			

<210> SEQ ID NO: 288
 <211> Longitud: 369
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 288
 gaggtgcagc tgttgagatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtt tatttcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
 gcaaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
 cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcgagcgcg 369

<210> SEQ ID NO: 289
 <211> Longitud: 123
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Gly	Thr	Glu
			20					25					30		
Gln	Met	Trp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Ile
		35					40					45			
Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	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	Arg	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Trp
		100						105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
		115					120								

<210> SEQ ID NO: 290

<211> Longitud: 369
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de ácidos nucleicos

<400> Secuencia: 290
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttggg acggagcaga tgtggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtt tatttcacgt attgattcgc ctggtgggag gacatactac 180
gcaaactccg tgcgtggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacggcga 300
cccacggggg tgtccgggac gttttatgac tactgggggtc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagcgcg 369

<210> SEQ ID NO: 291
<211> Longitud: 123
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Secuencia de aminoácidos

<400> Secuencia: 291
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Thr Glu
20 25 30
Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Ile
35 40 45
Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60
Arg 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 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference AXH/PB64388	FOR FURTHER ACTION	See item 4 below
International application No. PCT/EP2012/050061	International filing date (<i>day/month/year</i>) 04 January 2012 (04.01.2012)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 06 January 2011 (06.01.2011)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 *bis*.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 12 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

- | | | |
|-------------------------------------|--------------|---|
| ☒ | Box No. I | Basis of the report |
| ☒ | Box No. II | Priority |
| ☐ | Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☐ | Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ | Box No. V | Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☒ | Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ | Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☒ | Box No. VIII | Certain observations on the international application |

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Date of issuance of this report 10 July 2013 (10.07.2013) Authorized officer Agnès Wittmann-Regis e-mail: pt06.pct@wipo.int
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2012/050061

International filing date (day/month/year)
04.01.2012

Priority date (day/month/year)
06.01.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28

Applicant
GLAXO GROUP LIMITED

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1b(s)(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bumb, Peter

Telephone No. +31 70 340-8936



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☐ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☒ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2012/050061

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>2, 5-7, 9-12</u>
	No: Claims	<u>1, 3, 4, 8, 13-31</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-31</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-31</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item II

Priority

II.1

The applicant's copending application D1 (WO 2011/012609) was published on 03.02.2011, filed on 27.07.2010 and claims a priority of 29.07.2009 based on US 61/229334. This priority document is available to this International Search Authority and the corresponding priority claim has been found to be valid.

D1 discloses the following subject-matter:

DOM23h-271 (SEQ. 4) having

- 3 substitutions vis-à-vis present SEQ. 36
- 4 substitutions vis-à-vis present SEQs. 32-35
- 5 substitutions vis-à-vis present SEQs. 29-31.
- CDR1 is identical in all cases.

DOM23h-271-7 (SEQ. 15) having

- 1 substitutions vis-à-vis present SEQ. 36
- 2 substitutions vis-à-vis present SEQs. 32, 33, 35
- 3 substitutions vis-à-vis present SEQs. 31, 34
- 4 substitutions vis-à-vis present SEQ. 30
- 5 substitutions vis-à-vis present SEQ. 29
- CDR1 is identical in all cases. CDR2 is identical for present SEQs. 30, 32, 34-36. CDR3 is identical for present SEQs. 31 & 33.

DOM23h-271-13 (SEQ. 17) having

- 3 substitutions vis-à-vis present SEQ. 36
- 4 substitutions vis-à-vis present SEQs. 32, 33, 35
- 5 substitutions vis-à-vis present SEQs. 31, 34
- CDR1 is identical in all cases. CDR2 is identical for present SEQs. 30, 32, 34-36. CDR3 is identical for present SEQs. 31 & 33.

DOM23h-439 (SEQ. 10) having

1 substitutions vis-à-vis present SEQ. 208, which are outside CDR1, CDR2 and CDR3.

DOM23h-439-6 (SEQ. 22) having

3 substitutions vis-à-vis present SEQ. 208, which are outside CDR1 and CDR3

DOM23h-439-8 (SEQ. 23) having

4 substitutions vis-à-vis present SEQ. 208, which are outside CDR1 and CDR3

Furthermore, D1 discloses binding to human TGF β R2, neutralization, nucleic acids, vectors and host cells, methods of production, medical uses, e.g. for disorders associated with TGF β -signalling, e.g. tissue fibrosis, wound healing, scarring, keloid disease and intradermal delivery devices.

II.2

It follows that US 61/430235 cannot represent a valid first filing for the subject-matter of present claims 1, 3-4, 8, 13-14, 15-31. The priority claim for this subject-matter is thus invalid, the effective filing date for this subject-matter thus becomes 04.01.2012. D1 thus was published prior to this effective filing date.

II.3

D1 does not disclose the subject-matter of claims 2, 5-7, 9-12, 14. The ISA does not have access to the priority document US 61/430235. Barring evidence to the contrary, it is thus assumed that the priority claim is valid and the effective filing date for the subject-matter of claims 2, 5-7, 9-12, 14 is 06.01.2011.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

V.1 PRIOR ART

D1 (WO 2011/012609) has been discussed under Item II above.

D2 (WO 2010/053814) discloses three human anti-human TGF β R2 antibodies TGF1, TGF2 and TGF3 which have a KD of 11-78 pM and an IC50 for inhibition of TGF-ligand/receptor binding of 100-540 pM (Table 3). TGF2 and TGF3 crossreact with mouse TGF β R2 (p. 23 l. 2). The antibodies inhibit in vitro migration/invasion of tumour cells (pp. 24-25). D2 suggests the use of these mAbs for treating cancer and fibrotic disorders (pp. 26 -28).

D3 (EP 1248676) discloses human inhibitory monoclonal antibodies against TGF β R2 (e.g. claims 1-2), or antibody portions thereof, wherein such a portion may be a dAb (§ 89).

D4 (Weselowski 2009), D5 (Demarest 2008), D6 (Saerens 2008) and D7 (Chen 2008) disclose the existence of single domain antibody formats and the various advantages associated thereto (whole documents).

V.2 NOVELTY

V.2.1 - effective filing date 04.01.2012

From Item II above it follows that D1 is prejudicial to the novelty of claims 1, 3-4, 8, 13, 15-31 (ART. 33(2) PCT).

The Abs of D1 are from the same lineages (271, 439) as those of the underlying application and will inherently bind mouse or at least cynomolgus TGF β R2 (see e.g. present Table 14), at least to a low degree. D1 is prejudicial to the novelty of claim 14 (ART. 33(2) PCT).

V.2.2 - effective filing date 06.01.2011

The combinations of technical and functional features as per claims 2, 5-7, 9-12 is not known in the art and thus novel (ART. 33(2) PCT).

V.3 INVENTIVE STEP

V.3.1 - effective filing date 06.01.2011

CLOSEST PRIOR ART - D2 is considered the closest prior art to the claimed subject-matter as it attempts to solve the same technical problems as the application (inhibition of TGF β R2; treatment of fibrotic disorders) in the most similar manner (antibody; human derived).

V.3.2

TECHNICAL DIFFERENCE - (1) Claims 2, 5-7, 9-12 differ from D2 in that the claimed antibody is in dAb-format.

(2) Claim 2 also differs from D2, in that the claimed dAb comprises "117 of 122" residues of SEQ. 234 (DOM23h-439-25) or "119 of 124" residues of SEQ. 236 (DOM23h-439-123) (i.e. up to five amino acid modifications).

(3) Claims 5-6 also differ from D2, in that the claimed dAb comprises 100% of one of SEQs. 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 291.

(4) Claim 7 also differs from D2 in that the claimed dAb comprises a C-terminal alanine.

(5) Claims 9-10, 12 also differ from D2 in that the claimed dAb comprises at least one of R39, I48, D53, N61, R61, K61, R64, F64, D64, E64, M64, Y64, H102, S103.

(6) Claim 11 also differs from D2 in that the claimed dAb comprises a combination of N61+R64, R61+E64, R61+M64, R61+F64 or R61+Y64, R61+D64.

V.3.3

TECHNICAL EFFECT - The technical effect resulting from (1) the change from full-length antibody to dAb-format *per se* are associated with the well-known advantages of Dab-technology (see D4-D7), i.e. smaller size, less aggre

The technical effect resulting from (2) ca. 95% (= 5 modifications) of SEQ. 234 or SEQ. 236 are not apparent. Already a single substitution can have drastic effects on stability, affinity, IC50.

The technical effect resulting from (3) 100% of one of the cited SEQs is their respective inherent affinity and IC50.

SEQs. 1-18: IC50 ca. 20 pM - 30 nM (see Table 6); SEQs. 10, 13, 208: KD 80 pM, 378 nM, 941 nM, respectively (see Table 6A); SEQs. 29-31: KD 147-578 pM (see Table 7); SEQs. 32-36: KD 1.64-3.16 nM (see Table 8); SEQs. 37-38: KD 10-14.9 pM (see Table 12)

No effect has been determined for SEQs. 19-28 or 283-291. The overall technical effect is thus not apparent.

As far as (4) adding a C-terminal alanine to 95% of a dAb of claim 1 is concerned, a particular technical effect in terms of affinity/efficacy is not apparent since already a single amino acid substitution can already have drastic effect on affinity. Indeed, a lone C-terminal alanine addition seems to

reduce affinity (see present Table 14; DOM23h-439-40 (104 pM) vs. DOM23h-439-25 (82 pM; DOM23h-271-130 (123 pM) vs. DOM23h-271-123 (102 pM)). No particular technical effect is linked to the C-terminal alanine.

As far as **(5)** having one of R39, I48, D53, N61, R61, K61, R64, F64, D64, E64, M64, Y64, H102, S103 is concerned, a technical effect which is achieved over substantially the entire scope claimed is not apparent. The technical effect these substitutions have in an only 95% identical background, or. in e.g. in a SEQ. 1-18 background is not apparent. Single substitutions are claimed and only double-substitutions have been exemplified/characterized (e.g. Tables 10+11). V48I is only carried out in a 271-123 and 271-129 background, comprising additional substitutions. Example 9 always uses additional C-terminal alanine additions. R39, H102 and S103 are not carried out at all, or at least not mentioned in the examples.

As far as **(6)** having one of N61+R64, R61+E64, R61+M64, R61+F64 or R61+Y64, R61+D64 is concerned, a technical effect which is achieved over substantially the entire scope claimed is not apparent. Example 7 makes use of the 271 background, example 8 makes use of the specific 439-25 background comprising additional substitutions (p. 84). The 439 background or any SEQ. 1-18 background is not carried out.

The overall technical effect achieved by differences (2)-(5) is thus not apparent.

V.3.4

TECHNICAL PROBLEM - The objective technical problem can thus be formulated as *"How to provide an alternative, TGF β R2 neutralizing antibody-format ?"*.

SOLUTION - In claim 2 the applicant proposes to solve the technical problem by using a sequence which differs in five residues from SEQ. 234 or 236 .

In claim 5 the applicant proposes to solve the technical problem by using 100% of one of SEQs. 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 291.

In claim 7 the applicant proposes to solve the technical problem by adding a C-terminal alanine to ca. 95% of one of the above sequences.

In claims 9-10, 12 the applicant proposes to solve the technical problem by using a sequence which differs in five amino acids from one of SEQs. 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275,

277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 29, wherein one of these differences is a R39, I48, D53, N61, R61, K61, R64, F64, D64, E64, M64, Y64, H102, S103 substitution.

In claim 11 the applicant proposes to solve the technical problem by using a sequence which differs in five amino acids from one of SEQs. 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 29, wherein two of these differences are a N61+R64, R61+E64, R61+M64, R61+F64 or R61+Y64, R61+D64 double substitution.

V.3.5

CONCLUSION - At the effective filing date the dAb-format is routinely used (see D4-D6) and its advantages in view of its size are well-documented. The skilled person, in view of D2, would consider providing alternative antibody-formats which reproduce the inhibitory effects observed therein. Indeed, D3 explicitly suggests that anti-TGF β R2 dAbs should be raised (§89). The skilled person would thus routinely manufacture dAbs which inhibit TGF β R2 with a reasonable expectation of success. That such dAbs then have a range of affinities/IC50-values was also to be expected. Providing affinities which are worse than the benchmark provided in D2 does not provide a particular, surprising or unexpected technical effect.

SEQs. 1-18 provide IC50 values which are up to 2 orders of magnitude worse than those observed in D2. SEQs. 29-31, 37, 208, 234, 236, 240, 263, 269, 273, 275, 277 provide KD-values which are between 1.5x and almost 2 orders of magnitude worse than those observed in D2. SEQs. 19-28, 204-206, 214, 283-291 do not seem to have been characterized in terms of inhibitory/binding activity and no meaningful comparison vis-à-vis D2 can be made.

(1), (2), (3) Provision of anti-TGF β R2 dAbs *per se* which do not distinguish themselves vis-à-vis the function provided in D2 do not involve an inventive step.

(4) C-terminal alanine residues are not linked to a particular technical effect, when used singly are deemed an arbitrary modification and do not involve an inventive step.

(5)-(6) The cited single and double substitutions are not objectively linked to a technical effect (e.g. particular IC50 or KD-value) over the entire scope claimed (i.e. not for all dAb-backgrounds, not with up to five additional modifications), are deemed arbitrary modifications (e.g. in the SEQ. 1 background) and do not involve an inventive step.

Overall, the subject-matter of claims 2, 5-7, 9-12 does not involve an inventive step (ART. 33(3) PCT).

V.3.6

SEQs. 267 (DOM23h-439-42; KD = 3 pM), SEQs. 271 (DOM23h-439-44; KD = 3 pM) and SEQs. 279 (DOM23h-439-133; KD = 9 pM) as per claim 5 provide an unexpected improvement and benefit over D2 and involve an inventive step.

V.4 PATENTABILITY

V.4.1

Claims 22, 24-29 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment (see present claim 29), but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (<i>valid claim</i>) (day/month/year)
WO 2011/012609 (=D1)	03.02.2011	27.07.2010	29.07.2009

Re Item VIII

Certain observations on the international application

VIII.1 LACK OF CLARITY

VIII.1.1

Claim 9 uses Kabat numbering convention. Claims 11-12 refer back to e.g. claim 1 and only refer to position-numbers, not necessarily to Kabat-numbering. Claims 11-12 thus encompass substitutions of the actual residue 61, when counted from the N-terminus.

It is thus not clear which actual amino acid is actually supposed to be substituted. The subject-matter of claims 11-12 is unclear (ART. 6 PCT).

VIII.1.2

Claims 24 & 28 refer to "*diseases associated with TGF β -signalling*" which is unclear (ART. 6 PCT).

Firstly, this encompasses *any* diseases associated with such signalling, i.e. excessive signalling as well as insufficient signalling. The inhibitory dAbs of the invention are only suitable for treating excessive TGF β -signalling.

Secondly, it is not clear "*how*" said signalling is "*associated*". It is not clear whether said signalling is a causative factor, a curative response, or a coinciding, uninvolved marker.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2012/050061

International filing date (day/month/year)
04.01.2012

Priority date (day/month/year)
06.01.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28

Applicant
GLAXO GROUP LIMITED

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1b(s)(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bumb, Peter

Telephone No. +31 70 340-8936



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1 (a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☐ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☒ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2012/050061

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>2, 5-7, 9-12</u>
	No: Claims	<u>1, 3, 4, 8, 13-31</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-31</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-31</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item II

Priority

II.1

The applicant's copending application D1 (WO 2011/012609) was published on 03.02.2011, filed on 27.07.2010 and claims a priority of 29.07.2009 based on US 61/229334. This priority document is available to this International Search Authority and the corresponding priority claim has been found to be valid.

D1 discloses the following subject-matter:

DOM23h-271 (SEQ. 4) having

- 3 substitutions vis-à-vis present SEQ. 36
- 4 substitutions vis-à-vis present SEQs. 32-35
- 5 substitutions vis-à-vis present SEQs. 29-31.
- CDR1 is identical in all cases.

DOM23h-271-7 (SEQ. 15) having

- 1 substitutions vis-à-vis present SEQ. 36
- 2 substitutions vis-à-vis present SEQs. 32, 33, 35
- 3 substitutions vis-à-vis present SEQs. 31, 34
- 4 substitutions vis-à-vis present SEQ. 30
- 5 substitutions vis-à-vis present SEQ. 29
- CDR1 is identical in all cases. CDR2 is identical for present SEQs. 30, 32, 34-36. CDR3 is identical for present SEQs. 31 & 33.

DOM23h-271-13 (SEQ. 17) having

- 3 substitutions vis-à-vis present SEQ. 36
- 4 substitutions vis-à-vis present SEQs. 32, 33, 35
- 5 substitutions vis-à-vis present SEQs. 31, 34
- CDR1 is identical in all cases. CDR2 is identical for present SEQs. 30, 32, 34-36. CDR3 is identical for present SEQs. 31 & 33.

DOM23h-439 (SEQ. 10) having

1 substitutions vis-à-vis present SEQ. 208, which are outside CDR1, CDR2 and CDR3.

DOM23h-439-6 (SEQ. 22) having

3 substitutions vis-à-vis present SEQ. 208, which are outside CDR1 and CDR3

DOM23h-439-8 (SEQ. 23) having

4 substitutions vis-à-vis present SEQ. 208, which are outside CDR1 and CDR3

Furthermore, D1 discloses binding to human TGF β R2, neutralization, nucleic acids, vectors and host cells, methods of production, medical uses, e.g. for disorders associated with TGF β -signalling, e.g. tissue fibrosis, wound healing, scarring, keloid disease and intradermal delivery devices.

II.2

It follows that US 61/430235 cannot represent a valid first filing for the subject-matter of present claims 1, 3-4, 8, 13-14, 15-31. The priority claim for this subject-matter is thus invalid, the effective filing date for this subject-matter thus becomes 04.01.2012. D1 thus was published prior to this effective filing date.

II.3

D1 does not disclose the subject-matter of claims 2, 5-7, 9-12, 14. The ISA does not have access to the priority document US 61/430235. Barring evidence to the contrary, it is thus assumed that the priority claim is valid and the effective filing date for the subject-matter of claims 2, 5-7, 9-12, 14 is 06.01.2011.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

V.1 PRIOR ART

D1 (WO 2011/012609) has been discussed under Item II above.

D2 (WO 2010/053814) discloses three human anti-human TGF β R2 antibodies TGF1, TGF2 and TGF3 which have a KD of 11-78 pM and an IC50 for inhibition of TGF-ligand/receptor binding of 100-540 pM (Table 3). TGF2 and TGF3 crossreact with mouse TGF β R2 (p. 23 l. 2). The antibodies inhibit in vitro migration/invasion of tumour cells (pp. 24-25). D2 suggests the use of these mAbs for treating cancer and fibrotic disorders (pp. 26 -28).

D3 (EP 1248676) discloses human inhibitory monoclonal antibodies against TGF β R2 (e.g. claims 1-2), or antibody portions thereof, wherein such a portion may be a dAb (§ 89).

D4 (Weselowski 2009), D5 (Demarest 2008), D6 (Saerens 2008) and D7 (Chen 2008) disclose the existence of single domain antibody formats and the various advantages associated thereto (whole documents).

V.2 NOVELTY

V.2.1 - effective filing date 04.01.2012

From Item II above it follows that D1 is prejudicial to the novelty of claims 1, 3-4, 8, 13, 15-31 (ART. 33(2) PCT).

The Abs of D1 are from the same lineages (271, 439) as those of the underlying application and will inherently bind mouse or at least cynomolgus TGF β R2 (see e.g. present Table 14), at least to a low degree. D1 is prejudicial to the novelty of claim 14 (ART. 33(2) PCT).

V.2.2 - effective filing date 06.01.2011

The combinations of technical and functional features as per claims 2, 5-7, 9-12 is not known in the art and thus novel (ART. 33(2) PCT).

V.3 INVENTIVE STEP

V.3.1 - effective filing date 06.01.2011

CLOSEST PRIOR ART - D2 is considered the closest prior art to the claimed subject-matter as it attempts to solve the same technical problems as the application (inhibition of TGF β R2; treatment of fibrotic disorders) in the most similar manner (antibody; human derived).

V.3.2

TECHNICAL DIFFERENCE - (1) Claims 2, 5-7, 9-12 differ from D2 in that the claimed antibody is in dAb-format.

(2) Claim 2 also differs from D2, in that the claimed dAb comprises "117 of 122" residues of SEQ. 234 (DOM23h-439-25) or "119 of 124" residues of SEQ. 236 (DOM23h-439-123) (i.e. up to five amino acid modifications).

(3) Claims 5-6 also differ from D2, in that the claimed dAb comprises 100% of one of SEQs. 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 291.

(4) Claim 7 also differs from D2 in that the claimed dAb comprises a C-terminal alanine.

(5) Claims 9-10, 12 also differ from D2 in that the claimed dAb comprises at least one of R39, I48, D53, N61, R61, K61, R64, F64, D64, E64, M64, Y64, H102, S103.

(6) Claim 11 also differs from D2 in that the claimed dAb comprises a combination of N61+R64, R61+E64, R61+M64, R61+F64 or R61+Y64, R61+D64.

V.3.3

TECHNICAL EFFECT - The technical effect resulting from (1) the change from full-length antibody to dAb-format *per se* are associated with the well-known advantages of Dab-technology (see D4-D7), i.e. smaller size, less aggre

The technical effect resulting from (2) ca. 95% (= 5 modifications) of SEQ. 234 or SEQ. 236 are not apparent. Already a single substitution can have drastic effects on stability, affinity, IC50.

The technical effect resulting from (3) 100% of one of the cited SEQs is their respective inherent affinity and IC50.

SEQs. 1-18: IC50 ca. 20 pM - 30 nM (see Table 6); SEQs. 10, 13, 208: KD 80 pM, 378 nM, 941 nM, respectively (see Table 6A); SEQs. 29-31: KD 147-578 pM (see Table 7); SEQs. 32-36: KD 1.64-3.16 nM (see Table 8); SEQs. 37-38: KD 10-14.9 pM (see Table 12)

No effect has been determined for SEQs. 19-28 or 283-291. The overall technical effect is thus not apparent.

As far as (4) adding a C-terminal alanine to 95% of a dAb of claim 1 is concerned, a particular technical effect in terms of affinity/efficacy is not apparent since already a single amino acid substitution can already have drastic effect on affinity. Indeed, a lone C-terminal alanine addition seems to

reduce affinity (see present Table 14; DOM23h-439-40 (104 pM) vs. DOM23h-439-25 (82 pM; DOM23h-271-130 (123 pM) vs. DOM23h-271-123 (102 pM)). No particular technical effect is linked to the C-terminal alanine.

As far as **(5)** having one of R39, I48, D53, N61, R61, K61, R64, F64, D64, E64, M64, Y64, H102, S103 is concerned, a technical effect which is achieved over substantially the entire scope claimed is not apparent. The technical effect these substitutions have in an only 95% identical background, or. in e.g. in a SEQ. 1-18 background is not apparent. Single substitutions are claimed and only double-substitutions have been exemplified/characterized (e.g. Tables 10+11). V48I is only carried out in a 271-123 and 271-129 background, comprising additional substitutions. Example 9 always uses additional C-terminal alanine additions. R39, H102 and S103 are not carried out at all, or at least not mentioned in the examples.

As far as **(6)** having one of N61+R64, R61+E64, R61+M64, R61+F64 or R61+Y64, R61+D64 is concerned, a technical effect which is achieved over substantially the entire scope claimed is not apparent. Example 7 makes use of the 271 background, example 8 makes use of the specific 439-25 background comprising additional substitutions (p. 84). The 439 background or any SEQ. 1-18 background is not carried out.

The overall technical effect achieved by differences (2)-(5) is thus not apparent.

V.3.4

TECHNICAL PROBLEM - The objective technical problem can thus be formulated as *"How to provide an alternative, TGFβR2 neutralizing antibody-format ?"*.

SOLUTION - In claim 2 the applicant proposes to solve the technical problem by using a sequence which differs in five residues from SEQ. 234 or 236 .

In claim 5 the applicant proposes to solve the technical problem by using 100% of one of SEQs. 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 291.

In claim 7 the applicant proposes to solve the technical problem by adding a C-terminal alanine to ca. 95% of one of the above sequences.

In claims 9-10, 12 the applicant proposes to solve the technical problem by using a sequence which differs in five amino acids from one of SEQs. 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275,

277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 29, wherein one of these differences is a R39, I48, D53, N61, R61, K61, R64, F64, D64, E64, M64, Y64, H102, S103 substitution.

In claim 11 the applicant proposes to solve the technical problem by using a sequence which differs in five amino acids from one of SEQs. 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 29, wherein two of these differences are a N61+R64, R61+E64, R61+M64, R61+F64 or R61+Y64, R61+D64 double substitution.

V.3.5

CONCLUSION - At the effective filing date the dAb-format is routinely used (see D4-D6) and its advantages in view of its size are well-documented. The skilled person, in view of D2, would consider providing alternative antibody-formats which reproduce the inhibitory effects observed therein. Indeed, D3 explicitly suggests that anti-TGF β R2 dAbs should be raised (§89). The skilled person would thus routinely manufacture dAbs which inhibit TGF β R2 with a reasonable expectation of success. That such dAbs then have a range of affinities/IC50-values was also to be expected. Providing affinities which are worse than the benchmark provided in D2 does not provide a particular, surprising or unexpected technical effect.

SEQs. 1-18 provide IC50 values which are up to 2 orders of magnitude worse than those observed in D2. SEQs. 29-31, 37, 208, 234, 236, 240, 263, 269, 273, 275, 277 provide KD-values which are between 1.5x and almost 2 orders of magnitude worse than those observed in D2. SEQs. 19-28, 204-206, 214, 283-291 do not seem to have been characterized in terms of inhibitory/binding activity and no meaningful comparison vis-à-vis D2 can be made.

(1), (2), (3) Provision of anti-TGF β R2 dAbs *per se* which do not distinguish themselves vis-à-vis the function provided in D2 do not involve an inventive step.

(4) C-terminal alanine residues are not linked to a particular technical effect, when used singly are deemed an arbitrary modification and do not involve an inventive step.

(5)-(6) The cited single and double substitutions are not objectively linked to a technical effect (e.g. particular IC50 or KD-value) over the entire scope claimed (i.e. not for all dAb-backgrounds, not with up to five additional modifications), are deemed arbitrary modifications (e.g. in the SEQ. 1 background) and do not involve an inventive step.

Overall, the subject-matter of claims 2, 5-7, 9-12 does not involve an inventive step (ART. 33(3) PCT).

V.3.6

SEQs. 267 (DOM23h-439-42; KD = 3 pM), SEQs. 271 (DOM23h-439-44; KD = 3 pM) and SEQs. 279 (DOM23h-439-133; KD = 9 pM) as per claim 5 provide an unexpected improvement and benefit over D2 and involve an inventive step.

V.4 PATENTABILITY

V.4.1

Claims 22, 24-29 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment (see present claim 29), but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (<i>valid claim</i>) (day/month/year)
WO 2011/012609 (=D1)	03.02.2011	27.07.2010	29.07.2009

Re Item VIII

Certain observations on the international application

VIII.1 LACK OF CLARITY

VIII.1.1

Claim 9 uses Kabat numbering convention. Claims 11-12 refer back to e.g. claim 1 and only refer to position-numbers, not necessarily to Kabat-numbering. Claims 11-12 thus encompass substitutions of the actual residue 61, when counted from the N-terminus.

It is thus not clear which actual amino acid is actually supposed to be substituted. The subject-matter of claims 11-12 is unclear (ART. 6 PCT).

VIII.1.2

Claims 24 & 28 refer to "*diseases associated with TGF β -signalling*" which is unclear (ART. 6 PCT).

Firstly, this encompasses *any* diseases associated with such signalling, i.e. excessive signalling as well as insufficient signalling. The inhibitory dAbs of the invention are only suitable for treating excessive TGF β -signalling.

Secondly, it is not clear "*how*" said signalling is "*associated*". It is not clear whether said signalling is a causative factor, a curative response, or a coinciding, uninvolved marker.

ADVANCE E-MAIL

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HARRISON, Anna
GlaxoSmithKline
Global Patents (CN925.1)
980 Great West Road
Brentford
Middlesex TW8 9GS
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day/month/year) 15 May 2013 (15.05.2013)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference AXH/PB64388	
International application No. PCT/EP2012/050061	International filing date (day/month/year) 04 January 2012 (04.01.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address GLAXO GROUP LIMITED Glaxo Wellcome House Berkeley Avenue Greenford Middlesex UB6 0NN United Kingdom	State of Nationality GB	State of Residence GB
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address GLAXO GROUP LIMITED 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9GS United Kingdom	State of Nationality GB	State of Residence GB
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Blanc Veronique e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
Facsimile No. +41 22 338 82 70	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AXH/PB64388	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2012/050061	International filing date (<i>day/month/year</i>) 04/01/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 06/01/2011
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
- ☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/050061

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/050061

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The disclosure provides an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain. Suitably, an anti-TGFbetaRII immunoglobulin single variable domain in accordance with the disclosure is one having an amino acid sequence as set forth in any one of SEQ ID NO: 1-38, 204, 206, 208, 214, 234, 236, 238, 240, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289 or 291 having up to 5 amino acid substitutions, deletions or additions. The disclosure further provides a polypeptide and pharmaceutical composition for treating a disease associated with TGFbeta signalling and suitably a disease selected from the group of: tissue fibrosis, such as pulmonary fibrosis, including idiopathic pulmonary fibrosis; liver fibrosis, including cirrhosis and chronic hepatitis; rheumatoid arthritis; ocular disorders; fibrosis of the skin, including keloid of skin; Dupuytren's Contracture; kidney fibrosis such as nephritis and nephrosclerosis; wound healing; scarring reduction; and a vascular condition, such as restenosis.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/050061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2011/012609 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; DE WILDT RUDOLF MARIA [GB]; DIMECH CAROLINE J [G]) 3 February 2011 (2011-02-03) sequences 4,15,17 sequences 10,22,23	1-31
X	----- WO 2010/053814 A1 (IMCLONE LLC [US]; WU YAN [US]) 14 May 2010 (2010-05-14) table 3 page 23, line 2 page 24 - page 28	1-31
A	----- EP 1 245 676 A1 (JAPAN TOBACCO INC [JP] AMGEN FREMONT INC [US]) 2 October 2002 (2002-10-02) claims 1-2 paragraph [0089] -----	1-31
-/-		



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 2012

Date of mailing of the international search report

21/03/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/050061

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WESOLOWSKI JANUSZ ET AL: "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity", MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 198, no. 3, 16 June 2009 (2009-06-16) , pages 157-174, XP002610389, ISSN: 1432-1831, DOI: 10.1007/S00430-009-0116-7 the whole document -----	1-31
A	DEMAREST STEPHEN J ET AL: "Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 11, no. 5, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 675-687, XP008108499, ISSN: 1367-6733 the whole document -----	1-31
A	SAERENS DIRK ET AL: "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 8, no. 5, 1 October 2008 (2008-10-01) , pages 600-608, XP002610390, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2008.07.006 [retrieved on 2008-08-22] the whole document -----	1-31
A	CHEN W ET AL: "Construction of a large phage-displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 382, no. 3, 10 October 2008 (2008-10-10), pages 779-789, XP002610391, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2008.07.054 [retrieved on 2008-07-26] the whole document -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/050061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011012609	A2	03-02-2011	NONE
WO 2010053814	A1	14-05-2010	AR 073909 A1 09-12-2010
		AU 2009311375 A1 14-05-2010	
		CA 2742961 A1 14-05-2010	
		CN 102209727 A 05-10-2011	
		EA 201170659 A1 31-10-2011	
		EP 2356152 A1 17-08-2011	
		KR 20110067155 A 21-06-2011	
		PA 8846101 A1 28-06-2010	
		TW 201026326 A 16-07-2010	
		US 2010119516 A1 13-05-2010	
		WO 2010053814 A1 14-05-2010	
EP 1245676	A1	02-10-2002	AT 408628 T 15-10-2008
		AU 779871 B2 17-02-2005	
		AU 1415801 A 30-05-2001	
		AU 2005200044 A1 03-02-2005	
		CA 2389862 A1 25-05-2001	
		EP 1245676 A1 02-10-2002	
		ES 2313908 T3 16-03-2009	
		JP 2001206899 A 31-07-2001	
		US 7579186 B1 25-08-2009	
		WO 0136642 A1 25-05-2001	