

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 299**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2012 PCT/EP2012/050061**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO12093125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2012 E 12700019 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2661449**

54 Título: **Ligandos que se unen al receptor II del TGF-beta**

30 Prioridad:

**06.01.2011 US 201161430235 P**

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

**27.07.2017**

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road  
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**BEATON, ANDREW;  
DIMECH, CAROLINE;  
ERTL, PETER, FRANZ;  
FORD, SUSANNAH, KAREN y  
MCADAM, RUTH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 627 299 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Ligandos que se unen al receptor II del TGF-beta

**Antecedentes de la invención**

5 El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGFbeta; TGF $\beta$  (TGF- $\beta$ )) es una molécula de señalización que media la transducción de señales en las células mediante la unión a un receptor del TGFbeta (TGFbetaR; TGF $\beta$ R (TGF- $\beta$ R)). La actividad de señalización del TGFbeta regula la diferenciación y el crecimiento celular, y la naturaleza de su efecto, es decir, como activador del crecimiento celular, supresor del crecimiento o inductor de otras funciones celulares, dependiendo 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, 10 págs. 419-472).

El TGFbeta es producido por una amplia variedad de tipos de células, y sus receptores afines se expresan en una amplia variedad de órganos y células (véase Shi y Massague, *Cell*, volumen 113, número 6, 13 de junio de 2003, páginas 685-700; *Biol. Signals.*, vol. 5, pág. 232, 1996 y *Pulmonary Fibrosis*, vol. 80 de *Lung Biology in Health and Disease Series*, ed. por Phan, *et al.*, pág. 627, Dekker, Nueva York, 1995). Se han identificado receptores del 15 TGFbeta que pertenecen a tres tipos: TGFbetaRI (TGF $\beta$ RI) (receptor del TGFbeta tipo I (Franzen *et al.*, *Cell*, vol. 75, n° 4, pág. 681, 1993; n° de entrada en Genbank: L11695)); TGFbetaRII (TGF $\beta$ RII) (receptor del TGFbeta tipo II (Herbert *et al.*, *Cell*, vol. 68, n° 4, pág. 775, 1992; n° de entrada en Genbank: M85079)) y TGFbetaRIII (receptor del TGFbeta tipo III (López-Casillas, *Cell*, vol. 67, n° 4, pág. 785, 1991; n° de entrada en Genbank: L07594)). Se ha demostrado que el TGFbetaRI y el TGFbetaRII son esenciales para la transducción de señales del TGF-beta (Laiho 20 *et al.*, *J. Biol. Chem.*, vol. 265, pág. 18518, 1990 y Laiho *et al.*, *J. Biol. Chem.*, vol. 266, pág. 9108, 1991), mientras que no se piensa que el TGFbetaRIII sea esencial.

La señalización del TGFbeta es mediada por su unión tanto al TGFbetaRI como al 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 mediante la fosforilación de las proteínas Smad (véase Shi y Massague como 25 se mencionó anteriormente).

Se han identificado tres isoformas del TGFbeta en mamíferos: TGFbeta1, TGFbeta2 y TGFbeta3. Cada isoforma es multifuncional y actúa en mecanismos de retroalimentación autorreguladores para controlar la biodisponibilidad durante los procesos del desarrollo y mantener la homeostasis de los tejidos (según se examina en ten Dijke y Arthur, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, vol. 8, Nov. 2007, págs. 857-869). Las concentraciones del TGFbeta 30 se controlan por regulación mediante la expresión del TGFbeta, así como por la unión al proteoglicano, es decir, la matriz extracelular (MEC).

La señalización desregulada del TGFbeta, tal como el exceso de señalización del TGFbeta y las altas concentraciones del TGFbeta biodisponible, está implicada en muchas patologías, incluidas la fibrosis de varios tejidos, tales como la fibrosis pulmonar y la cirrosis, hepatitis crónica, artritis reumatoide, trastornos oculares, 35 restenosis vascular, queloide de la piel y el inicio de nefroesclerosis.

El documento WO2011/012609 describe algunos dominios variables únicos de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII, tal como el DOM23h-439.

Por consiguiente, hay necesidad de proporcionar compuestos que bloqueen o alteren la señalización del TGFbeta de manera específica, tal como mediante la unión al receptor II del TGFbeta. Dichos compuestos pueden usarse en 40 tratamientos.

**Compendio**

La descripción se refiere a un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII. En el primer aspecto, la presente invención proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ. ID. n° 267 que tiene hasta 5 sustituciones moderadas de 45 aminoácidos en donde dichas sustituciones moderadas de aminoácidos no están comprendidas en ninguna de las CDR y en donde dicho dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII se une al TGFbetaRII humano con una constante de disociación (KD) del equilibrio de aproximadamente 10 pM o menos medida por resonancia de plasmón de superficie. En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII tiene la secuencia SEQ. ID. n° 267.

50 Se proporciona también un polipéptido aislado que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII como se ha definido en el primer aspecto de la invención. En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido también se une a TGFbetaRII de ratón y/o TGFbetaRII de macaco. En una realización, el dominio variable único o polipéptido de inmunoglobulina neutraliza la actividad de TGFbeta o inhibe la unión de TGFbeta a TGFbetaRII. En una realización, el dominio variable único de 55 inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido se une a una región Fc del anticuerpo que comprende uno o ambos de los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente una región bisagra.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido como se ha definido anteriormente. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislado comprende al menos una molécula de ácido nucleico de la SEQ. ID. nº 266. La invención también proporciona un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. Se proporciona también una célula anfitriona que comprende dicho ácido nucleico o un vector.

Se proporciona además un método de producción de un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII como se ha definido anteriormente, comprendiendo el método mantener una célula anfitriona según la reivindicación 9, en condiciones adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico o vector, con lo que se produce un polipéptido que comprende una variable único de inmunoglobulina.

10 La invención proporciona además un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido como se ha definido anteriormente para su utilización como medicamento.

Además se proporciona una composición farmacéutica que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido como se ha definido anteriormente.

15 Además se proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido como se ha definido anteriormente para su utilización en elegir como objetivo el cáncer al modular la señalización del TGFbeta en la angiogenia tumoral.

Además se proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido, o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente, para su utilización en el tratamiento del cáncer, fibrosis hística, tal como la fibrosis pulmonar, incluida la fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis hepática, incluidas la cirrosis y la hepatitis crónica; artritis reumatoide; trastornos oculares; fibrosis de la piel, incluido el queoide de la piel, y contractura de Dupuytren; fibrosis renal tales como la nefritis y nefroesclerosis; cicatrización de heridas; reducción de cicatrices; y una enfermedad vascular, tal como la restenosis.

Además se proporciona la utilización de un dominio variable único anti-TGFbetaRII o polipéptido como se ha definido anteriormente en la preparación de un medicamento para su utilización en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo siguiente: cáncer, fibrosis hística, tal como la fibrosis pulmonar, incluida la fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis hepática, incluidas la cirrosis y la hepatitis crónica; artritis reumatoide; trastornos oculares; fibrosis de la piel, incluido el queoide de la piel, y contractura de Dupuytren; fibrosis renal tales como la nefritis y nefroesclerosis, cicatrización de heridas; reducción de cicatrices; y una enfermedad vascular, tal como la restenosis.

En un aspecto de la descripción, se proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ. ID. nº 1 a nº 38, nº 204, nº 206, nº 208, nº 214, nº 234, nº 236, nº 238, nº 240, nº 263, nº 265, nº 267, nº 269, nº 271, nº 273, nº 275, nº 277, nº 279, nº 281, nº 283, nº 285 y nº 287, y que tiene hasta 5 alteraciones de aminoácido, en donde cada alteración de aminoácido es una sustitución, eliminación o adición de aminoácido, es decir, hasta 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácido, en cualquier combinación. En una realización determinada, las sustituciones de aminoácido son sustituciones moderadas.

En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID nº 234 o nº 279, y tiene hasta 5 alteraciones de aminoácido, en donde cada alteración de aminoácido es una sustitución, eliminación o adición de aminoácido. En una realización determinada, las alteraciones de aminoácido no están en la CDR3, más específicamente no están en la CDR3 ni en la CDR1, ni en la CDR3 ni en la CDR2, más específicamente ni en ninguna de las CDR. En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII consiste de cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID nº 1 a nº 38, nº 204, nº 206, nº 208, nº 214, nº 234, nº 236, nº 238, nº 240, nº 263, nº 265, nº 267, nº 269, nº 271, nº 273, nº 275, nº 277, nº 279, nº 281, nº 283, nº 285 y nº 287. En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID nº 234 o 236.

45 No se pretende abarcar cualquier secuencia específica del dominio variable único 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 en la presente invención. En especial, pueden rechazarse DOM23h-271 (SEQ ID nº 4) y DOM-23h-439 (SEQ ID nº 10) como se describe en el documento WO 2011012609. En la presente memoria puede rechazarse un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID nº 199 o nº 201.

Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII según la descripción, puede comprender uno o más (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5) restos de alanina en el terminal C. Alternativamente, un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII puede comprender un péptido con terminal C de hasta 5 aminoácidos de longitud. En una realización, el péptido con terminal C comprende 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

55 Un experto en la técnica es capaz de deducir a partir de una secuencia del dominio variable único dada, p. ej., la que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEQ ID nº 1 a nº 38, nº 204, nº 206, nº 208, nº 214, nº 234, nº 236, nº 238, nº 240, nº 263, nº 265, nº 267, nº 269, nº 271, nº 273, nº 275, nº 277, nº 279, nº 281, nº 283, nº

285 y nº 287 cuyas secuencias de la CDR están contenidas dentro de ellas, usando los diversos métodos esbozados en la presente memoria, p. ej., secuencias de la CDR como se ha definido haciendo referencia a los métodos de Kabat (1987), Chothia (1989), AbM o por contacto, o una combinación de estos métodos. Convenientemente, las secuencias de la CDR se determinan empleando el método de Kabat descrito en la presente memoria. En una  
5 realización, las secuencias de la CDR de cada secuencia, son las expuestas en las tablas 1, 2, 9 y 13.

En un aspecto de la invención, un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 de la descripción tiene 90% o más de 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID nº 1 a nº 28.

10 En un aspecto, un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 de la descripción tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID nº 1 a nº 28, con 25 o menos cambios de aminoácido. En una realización determinada, un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 de la descripción tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID nº 1 a nº 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.

15 En un aspecto de la descripción, se proporciona un polipéptido aislado que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 de la descripción, en particular un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID nº 1 a nº 38, nº 204, nº 206, nº 208, nº 214, nº 234, nº 236, nº 238, nº 240, nº 263, nº 265, nº 267, nº 269, nº 271, nº 273, nº 275, nº 277, nº 279, nº 281, nº 283, nº 285 y nº 287, en donde dicho polipéptido aislado se une al TGFbetaR11.

20 En un aspecto de la descripción, se proporciona un polipéptido aislado codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de: las SEQ ID nº 39 a nº 66, en donde dicho polipéptido aislado se une al TGFbetaR11.

Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 o un polipéptido según cualquier aspecto de la descripción puede comprender cualquiera de los siguientes aminoácidos: R en la posición 39, I en la posición 48, D  
25 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 único de inmunoglobulina, siendo dicha posición según la convención de numeración de Kabat. En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido comprende una combinación de estos aminoácidos. En otra realización, el dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido comprende el  
30 aminoácido N en 61 y R en 64. En otra realización, el dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido comprende el aminoácido R o K en la posición 61. En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 comprende un I en la posición 48 además de cualquiera de los restos mencionados anteriormente en la posición 61 y/o 64. En estas realizaciones, la numeración de aminoácidos es la del dominio variable único de inmunoglobulina, según se ilustra, por ejemplo, mediante las secuencias dadas en las SEQ ID nº 1 a nº 38, nº 204,  
35 nº 206, nº 208, nº 214, nº 234, nº 236, nº 238, nº 240, nº 263, nº 265, nº 267, nº 269, nº 271, nº 273, nº 275, nº 277, nº 279, nº 281, nº 283, nº 285 y nº 287.

Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 o polipéptido según 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  
40 64; R en la posición 61 y F en la posición 64; R en la posición 61 e Y en la posición 64; y R en la posición 61 y D en la posición 64 del dominio variable único de inmunoglobulina. En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 comprende una I en la posición 48 además de cualquiera de las combinaciones de restos mencionadas anteriormente en las posiciones 61 y 64.

45 En otro aspecto, se describe un ligando o grupo de unión que tiene especificidad de unión por el TGFbetaR11 e inhibe la unión de un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID nº 1 a nº 28 al TGFbetaR11.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una proteína de fusión que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido o ligando según cualquier aspecto de la descripción.

50 En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión según la descripción, es uno que neutraliza la actividad del TGFbeta. Propiamente, el dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido según la descripción inhibe la unión del TGFbeta al TGFbetaR11. En otra realización, el dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido según la descripción, inhibe la actividad de señalización del TGFbeta por el TGFbetaR11. En otra realización, el dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido según la descripción suprime la actividad del TGFbeta, en especial, la actividad de crecimiento celular y/o la actividad  
55 fibrógena del TGFbeta. Convenientemente, el TGFbetaR11 es el TGFbetaR11 humano.

En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión según la descripción, carece de actividad agonista del TGFbetaR11 a 15 micromolar ( $\mu\text{M}$ ).

En otro aspecto, se proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión según cualquier aspecto de la descripción, que comprende además un grupo que prolonga la vida media. Propiamente, el grupo que prolonga la vida media es un grupo de polietilenglicol, albúmina de suero o uno de sus fragmentos, receptor de transferrina o una de sus partes que se unen a transferrina, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un punto de unión a un polipéptido que aumenta la vida media *in vivo*. En una realización, la parte que prolonga la vida media es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un punto de unión a albúmina de suero o al receptor de Fc neonatal. En otra realización, el grupo que prolonga la vida media es un dAb, anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En otro aspecto, la descripción proporciona un ácido nucleico recombinado o aislado que codifica un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11, polipéptido, ligando o proteína de fusión según cualquier aspecto de la descripción.

En una realización, la molécula de ácido nucleico recombinado o aislado comprende o consiste en una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID nº 39 a nº 76, nº 203, nº 205, nº 207, nº 212, nº 233, nº 235, nº 237, nº 239, nº 262, nº 264, nº 266, nº 268, nº 270, nº 272, nº 274, nº 276, nº 278, nº 280, nº 282, nº 284 y nº 286.

En un aspecto, la descripción proporciona un ácido nucleico recombinado 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 las SEQ ID nº 39 a nº 66, y en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina que se une específicamente al TGFbetaR11.

En otro aspecto, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico según la descripción.

En otro aspecto, se proporciona una célula anfitriona que comprende un ácido nucleico o un vector según la descripción. En aún otro aspecto de la descripción, se proporciona un método de producción de un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 o un polipéptido o ligando o una proteína de fusión según la descripción, comprendiendo el método mantener una célula anfitriona según la descripción en condiciones adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico o vector, por lo que se produce un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido o ligando o proteína de fusión. Opcionalmente, el método comprende además la etapa de aislar el polipéptido y opcionalmente producir una variante, p. ej., una variante mutada, con mejor afinidad (Kd); o EC50 para la neutralización del TGFbeta en un análisis habitual, que el polipéptido aislado. Análisis adecuados para la actividad del TGFbeta, tal como un análisis con detector de células, se describen en la presente memoria, por ejemplo, en el apartado Ejemplos.

En un aspecto de la descripción, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11, polipéptido o ligando o proteína de fusión según la descripción, es para su utilización como medicamento. Por consiguiente, se proporciona una composición que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11, polipéptido o ligando o proteína de fusión según la descripción, para su utilización como medicamento.

En un aspecto de la descripción, se proporciona una utilización de un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11, polipéptido o ligando o proteína de fusión según la descripción, en la preparación de un medicamento, en especial para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta.

Propiamente, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11, polipéptido o ligando o proteína de fusión o composición según la descripción, es para el tratamiento de una enfermedad relacionada con la señalización del TGFbeta. Propiamente, la enfermedad es una fibrosis hística, tal como fibrosis pulmonar incluida la fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis hepática, incluida la cirrosis y la hepatitis crónica; artritis reumatoide; trastornos oculares; o fibrosis de la piel incluido el queloides de la piel; contractura de Dupuytren; y fibrosis renal tal como nefritis y nefroesclerosis; o una enfermedad vascular tal como restenosis. Otras enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades vasculares tales como hipertensión, preeclampsia, telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (THH1), THH2, hipertensión arterial pulmonar, aneurismas de la aorta, síndrome de Marfan, trastorno de aneurisma familiar, síndrome de Loey-Dietz y síndrome de tortuosidad arterial (STA). Otras enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades del sistema musculoesquelético, tales como la distrofia muscular de Duchenne y fibrosis muscular. Otras enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta incluyen el cáncer, tales como cáncer de colon, gástrico y pancreático, así como glioma y NSCLC. Además, la descripción proporciona métodos para elegir como objetivo el cáncer modulando la señalización del TGFbeta en angiogenia tumoral. Otras enfermedades o afecciones incluyen las relacionadas con la cicatrización de tejidos. Otras enfermedades incluyen enfermedades pulmonares tales como EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica). Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11, polipéptido o ligando o proteína de fusión o composición según la descripción, puede utilizarse en la cicatrización de heridas y/o para evitar o mejorar la formación de cicatrices. En un aspecto, la descripción proporciona el dominio variable único anti-TGFbetaR11, ligando o antagonista, composición o proteína de fusión, para administración intradérmica. En un aspecto, la descripción proporciona el dominio variable único anti-TGFbetaR11, ligando o

antagonista o proteína de fusión, para administración a la piel de un paciente. En un aspecto, la descripción proporciona la utilización del dominio variable único anti-TGFbetaR11, ligando o antagonista o proteína de fusión, en la preparación de un medicamento para administración intradérmica. En un aspecto, la descripción proporciona la utilización del dominio variable único anti-TGFbetaR11 o antagonista o proteína de fusión según la descripción en la  
5 preparación de un medicamento para administración a la piel de un paciente.

En una realización, el dominio variable es sustancialmente monomérico. En una realización determinada, el dominio variable es 65%-98% monomérico en solución, según se determina por SEC-MALLS. En otra realización, 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 por SEC-MALLS.

10 En otra realización, el dominio variable, ligando, proteína de fusión o polipéptido según se describe en la presente, en particular cuando está en una composición farmacéutica, no contiene ninguna o una combinación o la totalidad de las siguientes modificaciones después de la traducción: desamidación, oxidación o glucosilación. En una realización determinada, el dominio variable, ligando, proteína de fusión o polipéptido según la descripción, no se desamida.

15 Propiamente, la composición es para tratamiento o profilaxis de una enfermedad mediada por el TGFbeta en una persona.

Por consiguiente, en una realización, se describe un dAb anti-TGFbetaR11 para el tratamiento de fibrosis de la piel, en particular la enfermedad queiloide o la contractura de Dupuytren. Propiamente, el dAb anti-TGFbetaR11 se proporciona como un dAb sustancialmente monomérico para administración intradérmica, preferiblemente  
20 careciendo de alguna etiqueta (es decir, sin etiqueta), tal como una etiqueta myc u otra de purificación.

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

En otro aspecto, se describe un método de tratamiento y/o prevención de una afección mediada por el TGFbeta en un paciente humano, comprendiendo el método administrar al paciente una composición que comprende un dominio  
25 variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11, polipéptido o ligando según la descripción.

En otro aspecto, la descripción proporciona un dispositivo de administración intradérmica que contiene una composición según la descripción. Propiamente, dicho dispositivo es una microaguja o colección de microagujas.

En otro aspecto, se describe un equipo que comprende un dominio variable único anti-TGFbetaR11 o polipéptido como se describe en la presente memoria y un dispositivo, tal como un dispositivo para administración intradérmica,  
30 para aplicar dicho dominio variable único o polipéptido a la piel.

### Descripción detallada

En esta memoria, la descripción se ha descrito, con referencia a realizaciones, de una manera que permite escribir una memoria clara y concisa. Se pretende y debe apreciarse que las realizaciones puedan combinarse o separarse de varias maneras sin apartarse de la descripción.

35 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido normalmente por los expertos en la técnica (p. ej., en técnicas y bioquímica de cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos e hibridación). Se usan técnicas normalizadas para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase en general, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y  
40 Ausubel, *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª ed; John Wiley & Sons, Inc.) y métodos químicos.

Inmunoglobulina: Como se emplea en esta memoria, el término "inmunoglobulina" se refiere a una familia de polipéptidos que conservan la característica de plegamiento de la inmunoglobulina de las moléculas de anticuerpo, las cuales contienen dos láminas  $\beta$  y, normalmente, un enlace disulfuro conservado.

45 Dominio: Como se emplea en esta memoria, "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que conserva 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 muchos casos pueden añadirse, eliminarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Por dominio variable único de anticuerpo o dominio variable único de inmunoglobulina, se entiende un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables del anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables  
50 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 prolongaciones del terminal N o C, así como fragmentos plegados o dominios variables que conservan al menos en parte la actividad de unión y especificidad de todo el dominio.

Único dominio variable de inmunoglobulina: La frase “dominio variable único de inmunoglobulina” se refiere a un dominio variable de anticuerpo ( $V_H$ ,  $V_{HH}$ ,  $V_L$ ) o a un 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 único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (p. ej., homo- o hetero-polímero) con otras regiones variables o dominios variables en donde las demás regiones o dominios no se requieren para la unión al antígeno por el dominio variable único de inmunoglobulina (es decir, en donde el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un “anticuerpo de dominio” o “dAb”, es un “dominio variable único de inmunoglobulina” tal como se emplea el término en esta memoria. Un “dominio variable único de anticuerpo”, es lo mismo que un “dominio variable único de inmunoglobulina” tal como se emplea el término en esta memoria. Un dominio variable único de inmunoglobulina es en una realización un dominio variable de anticuerpo humano, pero incluye también dominios variables únicos de anticuerpo de otras especies tales como los dAb de roedores (p. ej., como se describe en el documento WO 00/29004), tiburón nodriza y camélidos. Los  $V_{HH}$  de camélido son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que proceden de especies incluidas 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 único de inmunoglobulina se selecciona independientemente de dominios variables únicos de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo, p. ej.  $V_H$ ,  $V_L$  y  $V_{HH}$ .

Como se emplea en esta memoria, 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 unido a disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de configuración cerrada, scFv unido a disulfuro, diacuerpo), ya sea derivado de alguna especie que produzca naturalmente un anticuerpo, o creado por ingeniería genética; ya sea aislado de, por ejemplo, suero, linfocitos B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias.

Formato de anticuerpo: En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido o ligando según la descripción, puede proporcionarse en cualquier formato de anticuerpo. Como se emplea en esta memoria, el término “formato de anticuerpo” se refiere a cualquier estructura de polipéptido adecuada en la que uno o más dominios variables del anticuerpo pueden incorporarse 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 los anticuerpos híbridos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos monocatenarios, 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 (p. ej., un fragmento Fv (p. ej., Fv monocatenario (scFv), Fv unido a disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento  $F(ab')_2$ ), un dominio variable único de anticuerpo (p. ej., un dAb,  $V_H$ ,  $V_{HH}$ ,  $V_L$ ), y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (p. ej., modificadas por enlace covalente de polietilenglicol u otros polímeros adecuados o un  $V_{HH}$  humanizado). En una realización, los formatos de anticuerpo alternativos incluyen andamiajes alternativos en los que las CDR de cualquier molécula según la descripción pueden injertarse en un andamiaje o esqueleto de proteína adecuado, tal como un aficuerpo, un andamiaje de SpA, un dominio de clase A de receptor de LDL, un avímero (véase, p. ej., la solicitud de patente de EE.UU. publicación nº 2005/0053973, nº 2005/0089932 y nº 2005/0164301) o un dominio del EGF. Además, el ligando puede ser bivalente (heterobivalente) o polivalente (heteropolivalente), como se describe en la presente memoria. En otras realizaciones, puede usarse una “estructura universal”, en donde “estructura universal” se refiere a una única secuencia con estructura de anticuerpo que corresponde a las regiones de un anticuerpo conservadas en la secuencia como ha definido 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 estirpe germinativa humana, como han definido Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 910-917. La descripción proporciona la utilización de una única estructura, o una serie de dichas estructuras, que se ha visto que permiten la derivación de virtualmente cualquier especificidad de unión mediante la variación en las regiones hipervariables solas.

En realizaciones de la descripción descritas a lo largo de esta descripción, en lugar de la utilización de un “dAb” anti-TGFbetaR11 en un péptido o ligando de la descripción, se contempla que cualquier experto en la técnica pueda usar un polipéptido o dominio que comprenda una o más o las 3 CDR de un dAb de la descripción que se une al TGFbetaR11 (p. ej., las CDR injertadas en un andamiaje o esqueleto de proteína adecuado, p. ej., un aficuerpo, un andamiaje de SpA, un dominio de clase A del receptor de LDL o un dominio del EGF). La descripción en conjunto se debe considerar por consiguiente que proporciona la descripción de polipéptidos que utilizan dichos dominios en lugar de un dAb. A este respecto, véase el documento WO2008096158.

En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 es cualquier dominio variable de inmunoglobulina adecuado, y opcionalmente es un dominio variable humano o un dominio variable que comprende o procede de una región de estructura humana (p. ej., las regiones con estructura DP47 o DPK9).

Antígeno: Como se describe en la presente memoria, un “antígeno” es una molécula que está unida por un dominio de unión según la presente descripción. Generalmente, los antígenos están unidos por ligandos de anticuerpo y son capaces de provocar una respuesta de anticuerpo *in vivo*. Puede ser, por ejemplo, un polipéptido, proteína, ácido nucleico u otra molécula.

Epítopo: Un “epítopo” es una unidad de estructura unida convencionalmente por un par  $V_H/V_L$  de inmunoglobulina. Los epítomos definen el punto de unión mínimo para un anticuerpo, y de esta manera representan el objetivo de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo con un solo dominio, un epítopo representa la unidad de estructura unida por un dominio variable en aislamiento.

- 5 Unión: Generalmente, la unión específica está indicada por una constante de disociación (Kd) de 50 nanomolar o menos, opcionalmente 250 picomolar o menos. La unión específica de una proteína de unión al antígeno para un antígeno o epítopo puede determinarse mediante un análisis adecuado como por ejemplo, el análisis de Scatchard y/o análisis de unión competitiva, tales como radioinmunoanálisis (RIA), inmunoanálisis enzimáticos tales como ELISA y análisis de competencia en sándwich, y los diferentes variantes de los mismos.
- 10 Afinidad de unión: La afinidad de unión se determina opcionalmente usando la resonancia de plasmones de superficie (SPR) y 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 Myszk, 1998, *Methods in Enzymology* 295: 268) para hacer el seguimiento de las interacciones biomoleculares en tiempo real, y utiliza la resonancia de plasmones de superficie que puede detectar cambios en el
- 15 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 utilizando un sistema de resonancia de plasmones de superficie
- 20 BIACORE™ (BIACORE™, Inc.). Un chip biodetector es activado por el enlace covalente del objetivo según las instrucciones del fabricante (BIACORE™). El objetivo se diluye e inyecta a continuación sobre el chip para obtener una señal en unidades de respuesta de material inmovilizado. Dado que la señal en unidades de resonancia (UR) es proporcional a la masa del material inmovilizado, esto representa una gama de densidades del objetivo inmovilizado en la matriz. Los datos de disociación se ajustan a un modelo de un sólo sitio para obtener la  $k_{off}$  +/- d.t. (desviación típica de las mediciones). Se calculan las constantes de velocidad de pseudo primer orden (Kd) para cada curva de
- 25 asociación, y se representan en función de la concentración de proteína para obtener  $k_{on}$  +/- e.t. (error típico del ajuste). Las constantes de disociación en equilibrio para la unión, Kd, se calculan a partir de mediciones de la SPR como  $k_{off}/k_{on}$ .

- Otro aspecto de la descripción proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que se une específicamente al TGFbetaRII humano. En una realización, el dominio variable se une al TGFbetaRII humano con una constante de disociación (KD) en equilibrio de aproximadamente 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM o menos, 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, cuando el dominio variable tiene una
- 30 constante de disociación en equilibrio en el intervalo de aproximadamente 50 nM a 500 pM, es especialmente adecuado para administración local a un tejido de interés tal como el pulmón. En esta realización, una alta concentración de dicho enlazador de “afinidad moderada” puede proporcionarse como fármaco eficaz. En otra realización, el dominio variable se une al TGFbetaRII humano con una constante de disociación (KD) en equilibrio de aproximadamente 500 pM o menos, opcionalmente aproximadamente 450 pM, 400 pM, 350 pM, 300 pM, 250 pM,
- 35 200 pM, 150 pM, 100 pM, 50 pM o menos, opcionalmente aproximadamente 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM o menos. Convenientemente, cuando el dominio variable tiene una constante de disociación en el intervalo de aproximadamente 500 pM a 10 pM, es especialmente adecuado para administración general, de manera que la cantidad en cualquier tejido de interés, es suficiente para proporcionar un tratamiento eficaz. En esta realización, una baja concentración de dicho enlazador de “alta afinidad” puede proporcionarse como fármaco eficaz.
- 40 En una realización, los dominios variables únicos de la presente descripción presentan reactividad cruzada entre el TGFbetaRII humano y el TGFbetaRII de otra especie, tal como el TGFbetaRII de ratón. En esta realización, los dominios variables se unen específicamente al TGFbetaRII humano y de ratón. Esto es especialmente útil, ya que el desarrollo de fármacos requiere generalmente la prueba de candidatos de fármaco destacados en sistemas de ratón antes de que el fármaco se pruebe en personas. La provisión de un fármaco que puede unirse a las especies humana y de ratón permite probar los resultados en este sistema, y hacer comparaciones entre ellos de datos empleando el mismo fármaco. Esto evita la complicación de la necesidad de encontrar un fármaco que funcione contra un TGFbetaRII de ratón y un fármaco aparte que actúa contra el TGFbetaRII humano, y evita también la necesidad de comparar los resultados en personas y ratones usando fármacos no idénticos. Se contempla también la reactividad cruzada entre otras especies usadas en modelos de enfermedad tales como perros o monos tales
- 45 como el mono *cynomolgus*.

Opcionalmente, la afinidad de unión del dominio variable único de inmunoglobulina para al menos el TGFbetaRII de ratón, y la afinidad de unión por el TGFbetaRII humano, difieren en más de un factor de 10, 50 o 100.

- CDR: Los dominios variables únicos de inmunoglobulina (dAb) descritos en la presente memoria contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). Las posiciones de las CDR 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.
- 60

Government Printing Office (1991)). Las secuencias de aminoácidos de las CDR (CDR1, CDR2, CDR3) de los dAb V<sub>H</sub> (CDRH1, etc.) y V<sub>L</sub> (CDRL1, etc.) (V<sub>K</sub>) descritos en la presente memoria, serán muy evidentes para los expertos en la técnica en base al sistema de numeración de aminoácidos de Kabat bien conocido y la definición de las CDR. Según 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 resto H100 y H101 con letras hasta la K (es decir, H100, H100A ... H100K, H101). Las CDR pueden determinarse de forma alternativa usando el sistema de Chothia (basado en la posición de las regiones de bucle estructurales) (Chothia *et al.*, (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; *Nature* 342, págs. 877-883), según AbM (compromiso entre Kabat y Chothia), o según el método de Contact (basado en las estructuras cristalinas y la predicción de los restos de contacto con el antígeno) como sigue. Véase <http://www.bioinf.org.uk/abs/> para métodos adecuados para la determinación de las CDR.

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

Kabat:

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

15 CDR H2: 50-65

CDR H3: 95-102

CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

CDR L3: 89-97

20 Chothia:

CDR H1: 26-32

CDR H2: 52-56

CDR H3: 95-102

CDR L1: 24-34

25 CDR L2: 50-56

CDR L3: 89-97

AbM:

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

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

30 CDR H2: 50-58 -

CDR H3: 95-102 -

CDR L1: 24-34 -

CDR L2: 50-56 -

CDR L3: 89-97 -

35 Contact:

(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 -

40 CDR L1: 30-36 -

CDR L2: 46-55 -

CDR L3: 89-96 -

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

Por consiguiente, un experto en la técnica es capaz de deducir a partir de una secuencia de dominio variable único dado, p. ej., uno que tenga una secuencia como se expone en cualquiera de las SEQ ID n° 1 a n° 38, n° 204, n° 206, n° 208, n° 214, n° 234, n° 236, n° 238, n° 240, n° 263, n° 265, n° 267, n° 269, n° 271, n° 273, n° 275, n° 277, n° 279, n° 281, n° 283, n° 285 y n° 287, cuyas secuencias de la CDR estén contenidas dentro de ellas usando los varios métodos esbozados en la presente memoria. Por ejemplo, para una secuencia del dominio variable único dado, p. ej., SEQ ID n° 1, un 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 las expuestas en SEQ ID n° 77, n° 113 y n° 149, respectivamente. Convenientemente, las secuencias de la CDR se determinan usando el método de Kabat descrito en la presente memoria. En una realización, las secuencias de la CDR de cada secuencia son las expuestas en las tablas 1, 2, 9 y 13. En una realización, una secuencia de la CDR1 es una secuencia de la CDR1 seleccionada de las SEQ ID n° 77 a 112, n° 241, n° 244, n° 247 y n° 250. En una realización, una secuencia de la CDR2 es una secuencia de la CDR2 seleccionada de las SEQ ID n° 113 a n° 148, n° 242, n° 245, n° 248 y n° 251. En una realización, una secuencia de la CDR3 es una secuencia de la CDR3 seleccionada de SEQ ID n° 149 a n° 184, n° 243, n° 246, n° 249 y n° 252.

Una variante de la CDR o unidad de unión variante incluye una secuencia de aminoácidos modificada por al menos un aminoácido, en donde dicha modificación puede ser química o una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos (p. ej., de no más de 10 aminoácidos), modificación que permite que a la variante conservar las características biológicas de la secuencia inalterada. Por ejemplo, la variante es una variante funcional que se une específicamente al TGFbetaRII. Una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de la CDR puede ser por eliminación o sustitución de uno a varios aminoácidos, o por la adición o inserción de uno a varios aminoácidos, o por una de sus combinaciones (p. ej., de no más de 10 aminoácidos). La variante de la CDR o variante de la unidad de unión puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones, adiciones, o eliminaciones de aminoácidos, en cualquier combinación, en la secuencia de aminoácidos. La variante de la CDR o variante de la unidad de unión puede contener 1, 2 o 3 sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos, en cualquier combinación, en la secuencia de aminoácidos. Las sustituciones en los restos de aminoácido pueden ser sustituciones moderadas, por ejemplo, sustituyendo con un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrofobo alternativo. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida por valina o isoleucina.

TGFbetaRII: Como se emplea en esta memoria, el término "TGFbetaRII" (receptor del factor de crecimiento transformante beta tipo II; TGFβRII) se refiere a proteínas del TGFbetaRII de mamífero endógenas o de origen natural, y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que la de una proteína del TGFbetaRII de origen natural o de mamífero endógena correspondiente (p. ej., proteínas recombinadas, proteínas sintéticas (es decir, producidas empleando los métodos de química orgánica de síntesis)). Por consiguiente, como se define en la presente memoria, el término incluye la proteína del TGFbetaRII madura, variantes polimórficas o alélicas, y otras isoformas del TGFbetaRII y formas modificadas o no modificadas de las anteriores (p. ej., lipidadas, glucosiladas). El TGFbetaRII de origen natural o endógeno incluye proteínas sin tratamiento previo tales como TGFbetaRII maduro, variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas y formas mutantes que se producen de forma natural en mamíferos (p. ej., seres humanos, primates no humanos). Dichas proteínas pueden recuperarse o aislarse de una fuente que expresa TGFbetaRII de forma natural, por ejemplo, estas proteínas y las proteínas que tienen la misma secuencia de aminoácidos como un TGFbetaRII de origen natural o endógeno correspondiente, se citan por el nombre del mamífero correspondiente. Por ejemplo, cuando el mamífero correspondiente es un ser humano, la proteína se denomina TGFbetaRII humano. El TGFbetaRII humano es descrito, por ejemplo, por Lin, *et al.*, *Cell* 1992, vol. 68(4), págs. 775-785, y el n° de entrada M85079 en Genbank.

El TGFbetaRII humano es un receptor transmembrana que consta 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 emplea en esta memoria, el "TGFbetaRII" incluye también una parte o fragmento del TGFbetaRII. En una realización, dicha porción o fragmento incluye el dominio extracelular del TGFbetaRII o una parte del mismo.

Por "anti-TGFbetaRII" con relación a un dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido, ligando, proteína de fusión, etc., se entiende una resto que reconoce y se une al TGFbetaRII. En una realización un "anti-TGFbetaRII" reconoce específicamente y/o se une específicamente a la proteína TGFbetaRII y, convenientemente, el TGFbetaRII humano. En otra realización, el dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII según la descripción, se une también al TGFbetaRII de ratón (número de entrada NM\_029575 en el GenBank; 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 por cualquier análisis que mida un resultado de la señalización del TGFbeta. La señalización del TGFbeta se reseña, por ejemplo, en Itoh, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 2000, vol. 267, pág. 6954; Dennler, *et al.*, *Journal of Leucocyte Biol.* 2002, 71 (5), págs. 731-40. De esta manera, la actividad de TGFbeta puede probarse en numerosos ensayos diferentes bien conocidas por los expertos en la técnica. “Inhibición” o “neutralización” significa que una actividad biológica de TGFbeta se reduce total o parcialmente en presencia del dominio variable único de inmunoglobulina de la presente descripción en comparación con la actividad del TGFbeta en ausencia de dicho dominio variable único de inmunoglobulina.
- 5 En una realización, una inhibición o neutralización de la actividad del TGFbeta se prueba en un ensayo de liberación de IL-11. En esta realización, la capacidad del dominio variable único de inmunoglobulina según la descripción se prueba por su capacidad para inhibir la liberación de IL-11 estimulada por TGFbeta1 humano (TGFbeta1; TGF-β1) de células tales como las células A549. El TGFbeta1 (TGF-β1) se une directamente al TGFbetaRII (TGF-βRII), e induce el montaje del complejo TGFbetaRI/RII (TGF-βRI/II). El TGFbetaRI (TGF-βRI) se fosforila y es capaz de señalizar por varias vías incluida la vía Smad 4. La activación de la vía Smad 4 da lugar a la liberación de IL-11. La IL-11 se segrega en el sobrenadante celular y se mide entonces por ELISA colorimétrico. Ensayos de liberación de IL-11 adecuados se describen en la presente memoria, tales como el equipo de prueba de ELISA Quantikine para IL-11 humana suministrado por R & D Systems (ref. D1100).
- 10 En otra realización, la actividad del TGFbeta se prueba en un ensayo para la capacidad del dominio variable único de inmunoglobulina según la descripción, para inhibir la expresión de la CAGA-luciferasa inducida por el TGFbeta en células MC3T3-E1 en un ensayo de luciferasa en células MC3T3-E1. Tres copias de un motivo de secuencia sensible al TGFbeta, denominado secuencia CAGA, están presentes en el activador PAI-1 humano, y se unen específicamente a las proteínas Smad3 y 4. La clonación de múltiples copias de la secuencia CAGA en un montaje indicador de luciferasa, confiere sensibilidad del TGFbeta a las células transfectadas con el sistema indicador.
- 15 Ensayo adecuado se describe en la presente memoria, y utiliza células MC3T3-E1 (osteoblastos de ratón) transfectadas establemente con un montaje informador de [CAGA]<sub>12</sub>-luciferasa (Dennler, *et al.*, (1998) *EMBO J.* 17, 3091–3100).
- Otros ensayos adecuados incluyen un ensayo celular con beta-lactamasa SBE humana (INVITROGEN®, ensayo detector de células). Ejemplos de pruebas adecuadas se describen en la presente memoria.
- 20 Propiamente, el dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión según la descripción, no activa por sí mismo la señalización del receptor TGFbetaRII. Por consiguiente, en una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión según la descripción, carece de actividad agonista a 10 μM. La actividad agonista puede determinarse probando un compuesto de interés en un ensayo del TGFbetaRII como se describe en la presente memoria, en ausencia de TGFbeta. Cuando TGFbeta está ausente, la actividad agonista de un compuesto de interés se detectaría detectando la señalización del TGFbetaRII.
- 30 Homología: Secuencias similares u homólogas (p. ej., por lo menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia) a las secuencias descritas en la presente memoria, también forman parte de la descripción. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia respecto a aminoácidos puede ser de aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor. Respecto a 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. Alternativamente, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ácido nucleico hibridan en condiciones de hibridación selectiva (p. ej., 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.
- 35 Como se emplea en esta memoria, los términos condiciones de “baja severidad”, “media severidad”, “alta severidad” o “muy alta severidad”, describen condiciones para la hibridación y lavado de ácidos nucleicos. 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. Métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y ambos pueden usarse. Las condiciones de hibridación específicas referidas en la presente memoria, son las siguientes: (1) condiciones de hibridación a baja severidad en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% por lo menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse hasta 55°C para las condiciones de baja severidad); (2) condiciones de hibridación a severidad media en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 60°C; (3) condiciones de hibridación a alta severidad en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C; y opcionalmente (4) condiciones de hibridación a muy alta severidad son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido de uno o más lavados a 0,2X SSC, SDS a 1% a 65°C. Las condiciones a muy alta severidad (4) son las condiciones preferidas, y las que deben usarse a menos que se especifique de otra manera.
- 40 Los cálculos de “homología” o “identidad de secuencia” o “similitud” entre dos secuencias (los términos se usan indistintamente en la presente memoria), se llevan a cabo de la manera siguiente. Las secuencias se alinean para la
- 45
- 50
- 55
- 60

- comparación óptima (p. ej., pueden introducirse espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para alineación óptima, y las secuencias no homólogas pueden ser pasadas por alto para la comparación). En una realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada para la comparación es por lo menos aproximadamente 30%, opcionalmente por lo menos aproximadamente 40%,  
 5 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 restos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes se comparan entonces. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en  
 10 la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se emplea en esta memoria, "homología" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos). El porcentaje 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, y la longitud de cada espacio, que necesitan ser introducidos para la alineación óptima de las dos secuencias.
- 15 Las alineaciones y la homología, similitud o identidad de las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos, como se definen en la presente memoria, se preparan y se determinan opcionalmente usando el algoritmo BLAST 2 Sequences, utilizando parámetros predeterminados (Tatusova, T. A. *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.*, 174:187-188 (1999)). Alternativamente, se emplea el algoritmo BLAST (versión 2.0) para la alineación de secuencias, con parámetros establecidos para valores predeterminados. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), es el algoritmo  
 20 heurístico de búsqueda empleado 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 emplea en esta memoria, el término "ligando" se refiere a un compuesto que comprende por lo menos un grupo péptido, polipéptido o proteína que tiene un punto de unión con especificidad de unión por el  
 25 TGFbetaRII. Puede referirse también a un ligando como un "grupo de unión".

- Los ligandos o grupos de unión según la descripción, comprenden opcionalmente dominios variables de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades de unión, y no contienen pares de dominio variables que forman juntos un punto de unión para el compuesto objetivo (es decir, no comprenden un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que forman juntos  
 30 un punto de unión para el TGFbetaRII). Opcionalmente, cada dominio que tiene un punto de unión que tiene especificidad de unión por un objetivo, es un dominio variable único de inmunoglobulina (p. ej., dominio variable único de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., V<sub>H</sub>, V<sub>HH</sub>), dominio variable único de la cadena ligera de inmunoglobulina (p. ej., V<sub>L</sub>)) que tiene especificidad de unión por un objetivo deseado (p. ej., el TGFbetaRII).

- De esta manera, los "ligandos" incluyen polipéptidos que comprenden dos o más dominios variables únicos de  
 35 inmunoglobulina, en donde cada dominio variable único de inmunoglobulina se une a un objetivo diferente. Los ligandos incluyen también polipéptidos que comprenden por lo menos dos dominios variables únicos de inmunoglobulina o las secuencias de la CDR de los dominios variables únicos que se unen a diferentes objetivos en un formato adecuado, tal como un formato de anticuerpo (p. ej., formato tipo IgG, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>) o un andamiaje o esqueleto de proteína adecuado, tal como un aficuerpo, un andamiaje de SpA, un dominio de clase A  
 40 de receptor de LDL, un dominio del EGF, avímero y ligandos bi- y multi-específicos como se describen en la presente memoria.

- El dominio del polipéptido que tiene un punto de unión que tiene especificidad de unión por un objetivo (p. ej., el TGFbetaRII), puede ser también un dominio de proteína que comprende un punto de unión para un objetivo deseado, p. ej., un dominio de proteína se selecciona de un aficuerpo, un dominio de SpA, un dominio de clase A de  
 45 receptor de LDL, un avímero (véase, p. ej., las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0053973, n° 2005/0089932 y n° 2005/0164301). Si se desea, un "ligando" puede comprender además uno o más grupos adicionales que pueden ser cada uno independientemente un grupo péptido, polipéptido o proteína, o un grupo no peptídico (p. ej., un polialquilenglicol, un lípido, un hidrato de carbono). Por ejemplo, el ligando puede comprender además un grupo que prolonga la vida media como se describe en la presente memoria (p. ej., un grupo  
 50 polialquilenglicol, un grupo que comprende albúmina, un fragmento de albúmina o variante de albúmina, un grupo que comprende transferrina, un fragmento de transferrina o variante de transferrina, un grupo que se une a albúmina, o un grupo que se une al receptor de Fc neonatal).

- Compíte: Como se refiere en la presente memoria, el término "compíte" significa que la unión de un primer objetivo (p. ej., el TGFbetaRII) a su dominio de unión objetivo afín (p. ej., dominio variable único de inmunoglobulina), se  
 55 inhibe en presencia de un segundo dominio de unión (p. ej., dominio variable único de inmunoglobulina) que es específico para dicho objetivo afín. Por ejemplo, la unión puede inhibirse estéricamente, por ejemplo, por bloqueo físico de un dominio de unión o por alteración de la estructura o el medio de un dominio de unión, de manera que su afinidad o avidéz por un objetivo se reduce. Para detalles véase el documento WO2006038027 de cómo llevar a cabo el ELISA de competencia y experimentos BIACORE™ de competencia para determinar la competencia entre el  
 60 primer y segundo dominios de unión. La descripción incluye proteínas de unión al antígeno, específicamente dominios variables únicos, polipéptidos, ligandos y proteínas de fusión, que compiten con cualquiera de los dominios

variables únicos de SEQ ID nº 1 a nº 38. En una realización determinada, se proporciona una proteína de unión al TGFbetaR11 que compite con cualquiera de los dominios variables únicos de SEQ ID nº 1 a nº 38, y tiene también una KD de 50 nM o menos para el TGFbetaR11. En una realización determinada, la KD está comprendida entre 10 pM y 50 nM. En una realización determinada, la KD está comprendida entre 10 pM y 10 nM. En una realización determinada, la KD está comprendida entre 100 pM y 10 nM. En una realización determinada, la KD es de aproximadamente 100 pM.

Señalización del TGFbeta: Propiamente, el dominio variable único, polipéptido o ligando de la descripción, puede neutralizar la señalización del TGFbeta mediante el TGFbetaR11. Por "neutralizar", se entiende que el efecto de señalización normal del TGFbeta está bloqueado, de manera que la presencia del TGFbeta tiene un efecto neutro sobre la señalización del TGFbetaR11. Los métodos adecuados para medir un efecto de neutralización incluyen ensayos para la señalización del TGFbeta como se describen en la presente memoria. En una realización, la neutralización se observa como un % de inhibición de la actividad del TGFbeta en un ensayo de señalización del TGFbeta. En una realización, el dominio variable único o polipéptido se une al dominio extracelular del TGFbetaR11, inhibiendo/bloqueando de esta manera la unión del TGFbeta al dominio extracelular del TGFbetaR11. Convenientemente, el dominio variable único o polipéptido es útil en donde existe un exceso del TGFbeta biodisponible, y el dominio variable único o polipéptido sirve para inhibir la actividad de señalización del TGFbeta biodisponible, mediante la inhibición de la unión del TGFbeta a su receptor afín TGFbetaR11.

Como se emplea en esta memoria, el término "antagonista del TGFbetaR11" o "antagonista anti-TGFbetaR11" o similares, se refiere a un agente (p. ej., una molécula, un compuesto) que se une al TGFbetaR11 y puede inhibir una función (es decir, una o más funciones) del TGFbetaR11. Por ejemplo, un antagonista del TGFbetaR11 puede inhibir la unión del TGFbeta al TGFbetaR11 y/o inhibir la transducción de señales mediada por el TGFbetaR11. Por consiguiente, procesos y respuestas celulares mediados por el TGFbeta pueden ser inhibidos con un antagonista del TGFbetaR11.

En una realización, el ligando (p. ej., dominio variable único de inmunoglobulina) que se une al TGFbetaR11 inhibe la unión del TGFbeta a un receptor TGFbetaR11 con una concentración inhibitoria 50 (CI50) que es  $\leq$  aproximadamente 10  $\mu$ M,  $\leq$  aproximadamente 1  $\mu$ 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 realización determinada, un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 de la descripción tiene una CI50 de 15  $\mu$ M o menos. La CI50 se determina opcionalmente usando un ensayo de unión al receptor del TGFbeta *in vitro*, o una prueba celular, tal como la prueba descrita en la presente memoria.

Se contempla también que el ligando (p. ej., dominio variable único de inmunoglobulina) inhibe opcionalmente las funciones inducidas por el TGFbetaR11 en una prueba *in vitro* adecuada con una dosis de neutralización 50 (DN50) que es  $\leq$  aproximadamente 10  $\mu$ M,  $\leq$  aproximadamente 1  $\mu$ 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 realización determinada, un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 de la descripción, logra más de 40% de neutralización del TGF- $\beta$ .

"Ligando específico doble": En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido o ligando según la descripción, puede ser parte de un "ligando específico doble", que se refiere a un ligando que comprende un primer punto de unión al antígeno o epítipo (p. ej., primer dominio variable único de inmunoglobulina) y un segundo punto de unión al antígeno o epítipo (p. ej., segundo dominio variable único de inmunoglobulina), en donde los puntos de unión o dominios variables son capaces de unirse a dos antígenos (p. ej., diferentes antígenos o dos copias del mismo antígeno) o dos epítopos en el mismo antígeno que no están normalmente unidos por una inmunoglobulina monoespecífica. Por ejemplo, los dos epítopos pueden estar en el mismo antígeno, pero no son el mismo epítipo o están suficientemente adyacentes para unirse por un ligando monoespecífico. En una realización, los ligandos específicos dobles según la descripción están compuestos de puntos de unión o dominios variables que tienen diferentes especificidades, y no contienen pares de dominio variables complementarios entre sí (es decir, pares  $V_H/V_L$ ) que tienen la misma especificidad (es decir, no forman un punto de unión unitario).

En una realización, un "ligando específico doble" puede unirse al TGFbetaR11 y a otra molécula objetivo. Por ejemplo, otra molécula objetivo puede ser una molécula objetivo específica para tejidos, de manera que el ligando específico doble de la descripción permite que un polipéptido anti-TGFbetaR11 o dominio variable único de inmunoglobulina según la descripción, sea dirigido hacia un tejido de interés. Dichos tejidos incluyen pulmón, hígado, etc.

Se describen también polímeros de dAb multiespecíficos. Esto incluye un polímero de dAb que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 según cualquier aspecto de la descripción y uno o más dominios variables únicos, cada uno de los cuales se une a un objetivo diferente (p. ej., un objetivo diferente del TGFbetaR11). En una realización, se proporciona un polímero de dAb biespecífico, por ejemplo, un polímero de dAb que comprende uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina anti-TGFbetaR11 según cualquier aspecto

de la descripción, y uno o más dAb que se unen a un segundo objetivo diferente. En una realización, se describe un polímero de dAb trispecífico.

Los ligandos de la descripción (p. ej., polipéptidos, dAb y antagonistas) pueden formarse como una proteína de fusión que contiene un primer dominio variable único de inmunoglobulina que se fusiona directamente a un segundo dominio variable único de inmunoglobulina. Si se desea, dicho formato puede comprender además un grupo que prolonga la vida media. Por ejemplo, el ligando puede comprender un primer dominio variable único de inmunoglobulina que se fusiona directamente con un segundo dominio variable único de inmunoglobulina que se fusiona directamente a un dominio variable único de inmunoglobulina que se une a la albúmina de suero.

En general, la orientación de los dominios del polipéptido que tienen un punto 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 proporcionar mejores características de unión que otras orientaciones. Todas las orientaciones (p. ej., dAb1-enlazador-dAb2; dAb2-enlazador-dAb1) están comprendidas en la descripción. Los ligandos que contienen una orientación que proporciona las características de unión deseadas pueden identificarse fácilmente por tamizado.

Los polipéptidos y los dAb según la descripción, incluidos monómeros, dímeros y trímeros de dAb, pueden unirse a una región Fc de anticuerpo, comprendiendo uno o ambos de los dominios C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3, y opcionalmente una región bisagra. Por ejemplo, vectores que codifican ligandos unidos como una secuencia de nucleótidos única a una región Fc, pueden emplearse para preparar dichos polipéptidos. En una realización, se proporciona una fusión dAb-Fc.

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

Objetivo: Como se emplea en esta memoria, el término "objetivo" se refiere a una molécula biológica (p. ej., péptido, polipéptido, proteína, lípido, hidrato de carbono) a la que puede unirse un dominio de polipéptido que tiene un punto de unión. El objetivo puede ser, por ejemplo, un objetivo intracelular (p. ej., un objetivo de proteína intracelular), un objetivo soluble (p. ej., un objetivo segregado) o un objetivo de la superficie de la célula (p. ej., una proteína de membrana, una proteína de receptor). En una realización, el objetivo es el TGFbetaRII. En otra realización, el objetivo es el dominio extracelular del TGFbetaRII.

Complementarios: Como se emplea en esta memoria, "complementarios" se refiere a cuando dos dominios de inmunoglobulina pertenecen a familias de estructuras que forman pares o grupos afines o proceden de dichas familias, y conservan esta característica. Por ejemplo, un dominio V<sub>H</sub> y un dominio V<sub>L</sub> de un anticuerpo son complementarios; dos dominios V<sub>H</sub> no son complementarios, y dos dominios V<sub>L</sub> no son complementarios. Pueden encontrarse dominios complementarios en otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, tales como los dominios V<sub>α</sub> y V<sub>β</sub> (o γ y δ) del receptor de linfocitos T. Los dominios que son artificiales, tales como los dominios basados en andamiajes de proteína que no se unen a epítopos a menos que sean modificados genéticamente de esta manera, no son complementarios. Asimismo, dos dominios basados en (p. ej.) un dominio de inmunoglobulina y un dominio de fibronectina, no son complementarios.

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

Moléculas de ácido nucleico, vectores y células anfitrionas: La descripción proporciona también moléculas de ácido nucleico aislados y/o recombinados que codifican ligandos (dominios variables únicos, proteínas de fusión, polipéptidos, ligandos específicos dobles y ligandos multiespecíficos), como se describe en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos mencionados 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 (p. ej., como existe en las células o en una mezcla de ácidos nucleicos tal como una genoteca), e incluyen los ácidos nucleicos obtenidos por los métodos descritos en la presente memoria u otros métodos adecuados, incluidos los ácidos nucleicos esencialmente puros, ácidos nucleicos producidos por síntesis química, mediante combinaciones de métodos biológicos y químicos, y ácidos nucleicos recombinados que están aislados (véase, p. ej., 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 mencionados en la presente como "recombinados", son ácidos nucleicos que han sido producidos por ingeniería genética, incluidos esos ácidos nucleicos que se generan por 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 empleando enzimas de restricción.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico aislado y/o recombinado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido o ligando, como se describe en la presente memoria, 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 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 memoria, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID nº 1 a nº 38. La identidad de secuencia de nucleótidos puede determinarse en toda la longitud de la secuencia de nucleótidos que codifica el dAb anti-TGFbetaRII seleccionado. En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico por lo menos 80% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID nº 39 a nº 66. En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID nº 39 a nº 76.

Las realizaciones de la descripción proporcionan también secuencias de nucleótidos optimizadas en codones que codifican polipéptidos y dominios variables como se describe en la presente memoria, p. ej., optimizadas para la expresión en células de bacterias, mamíferos o levaduras.

La descripción proporciona también un vector que comprende una molécula de ácido nucleico recombinado de la descripción. En determinadas realizaciones, el vector es un vector de expresión que comprende uno o más elementos o secuencias de control de la expresión que están enlazados operativamente al ácido nucleico recombinado de la descripción. La descripción proporciona también una célula anfitriona recombinada que comprende una molécula de ácido nucleico recombinado o vector de la descripción. Vectores adecuados (p. ej., plásmidos, fagémidos), elementos de control de la expresión, células anfitrionas y métodos para producir células anfitrionas recombinadas de la descripción, son bien conocidos en la técnica, y ejemplos de ellos se describen además en la presente memoria.

Vectores de expresión adecuados pueden contener numerosos 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 (p. ej., activador, potenciador, terminador) y/o una o más señales de traducción, una secuencia señal o secuencia principal y similares. Los elementos de control de la expresión y una secuencia señal, si están presentes, pueden ser proporcionados 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 una cadena de anticuerpo, pueden emplearse para dirigir la expresión.

Puede proporcionarse un activador para expresión en una célula anfitriona deseada. Los activadores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un activador puede enlazarse operativamente a un ácido nucleico que codifique un anticuerpo, cadena de anticuerpos o parte de la misma, de modo que dirija la transcripción del ácido nucleico. Está disponible una variedad de activadores adecuados para anfitriones procarióticos (p. ej., activadores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*) y eucarióticos (p. ej., activador precoz o tardío del virus símico 40, activador de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, activador de citomegalovirus, activador tardío de adenovirus).

Además, los vectores de expresión comprenden generalmente un marcador seleccionable para la selección de células anfitrionas que llevan el vector y, en el caso de un vector de expresión replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos son marcadores seleccionables frecuentes y pueden usarse en células procarióticas (p. ej., gen de lactamasa (para resistencia a la ampicilina), gen Tet (para resistencia a tetraciclina) y eucarióticas (p. ej., genes con resistencia a la neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), a la ampicilina o a la higromicina). Los genes marcadores de dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de anfitriones. Los genes que codifican el producto génico de marcadores auxótrofos del anfitrión (p. ej., LEU2, URA3, HIS3), se usan con frecuencia como marcadores seleccionables en levaduras. Se contempla también el uso de vectores víricos (p. ej., baculovirus) o de fagos, y vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula anfitriona, tales como los vectores retrovíricos. 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 anfitrionas adecuadas pueden ser procarióticas, incluidas las células bacterianas tales como *E. coli*, *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; células eucarióticas, tales como células de hongos o levaduras (p. ej., *Pichia pastoris*, *Aspergillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*) u otras células eucarióticas inferiores, y células de eucariotas superiores tales como las de insectos (p. ej., *Drosophila*, células S2 de Schnieder, células Sf9 de insecto (documento WO 94/26087 (O'Connor)), de mamíferos (p. ej., células COS, tales como COS-1 (nº de entrada en la ATCC CRL-1650) y COS-7 (nº de entrada en la ATCC CRL-1651), y células CHO (p. ej., nº de entrada en la ATCC CRL-9096, CHO DG44 (Urlaub, G. y Chasin, LA., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7):4216-4220 (1980))), 293 (nº de entrada en la ATCC CRL-1573), HeLa (nº de entrada en la ATCC CCL-2), CV1 (nº de entrada en 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)), células NS0, SP2/0, HuT 78, similares, o vegetales (p. ej., 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 realizaciones, la célula anfitriona es una célula anfitriona aislada y no forma parte de un organismo pluricelular (p. ej., vegetal o animal). En determinadas

realizaciones, la célula anfitriona es una célula anfitriona no humana. La descripción proporciona también un método para producir un ligando (p. ej., ligando específico doble, ligando multiespecífico) de la descripción, que comprende mantener una célula anfitriona recombinada que comprende un ácido nucleico recombinado de la descripción en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinado, por lo cual se expresa el ácido nucleico recombinado y se produce un ligando. En algunas realizaciones, el método comprende además aislar el ligando.

Se hace referencia al documento WO200708515, página 161, línea 24 a página 189, línea 10, para detalles de la descripción que es aplicable a las realizaciones de la presente descripción. Esto incluye la descripción presentada en el documento WO200708515, página 161 línea 24, a página 189 línea 10, que proporciona detalles de la "Preparación de ligandos basados en inmunoglobulina", "Sistemas de vectores de biblioteca", "Construcción de bibliotecas", "Combinación de dominios variables únicos", "Caracterización de ligandos", "Estructura de los ligandos", "Esqueletos", "Andamiajes de proteína", "Andamiajes para su uso en la construcción de ligandos", "Diversificación de la secuencia canónica" y "Composiciones y usos terapéuticos y de diagnóstico", así como definiciones de "operativamente unido", "sin tratamiento previo", "prevención", "supresión", "tratamiento", "enfermedad alérgica", "enfermedad mediada por Th2", "dosis terapéuticamente eficaz" y "eficaz".

La frase "vida media", se refiere al tiempo transcurrido para que la concentración del dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido o ligando en suero, se reduzca en el 50%, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del ligando y/o a la eliminación o el secuestro del ligando por mecanismos naturales. Los ligandos de la descripción pueden ser estabilizados *in vivo*, y su vida media puede ser aumentada por la unión a moléculas que resisten a la degradación y/o a la eliminación o al secuestro. Generalmente, dichas moléculas son proteínas de origen 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*, durante un período más largo que un ligando similar que no es específico para la molécula que 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 HSA no está presente, es decir, no se une a HSA, pero se une a otra molécula. Generalmente, la vida media ha aumentado en 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más. Son posibles aumentos en el intervalo de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x o más, de la vida media. Alternativamente, o además, son posibles aumentos en el intervalo de hasta 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x o 150x de la vida media.

Formatos: El aumento de la vida media puede ser útil en aplicaciones de las inmunoglobulinas *in vivo*, especialmente anticuerpos y más especialmente fragmentos de anticuerpo de pequeño tamaño. Dichos fragmentos (Fv, Fv unidos por disulfuro, Fab, scFv, dAb) son en general rápidamente eliminados del cuerpo. Los dAb, polipéptidos o ligandos según la descripción, pueden ser adaptados para proporcionar aumento de la vida media *in vivo*, y en consecuencia tiempos de persistencia más largos en el cuerpo de la actividad funcional del ligando.

Métodos para el análisis farmacocinético y la determinación de la vida media del ligando, serán bien conocidos por los expertos en la técnica. 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, 2ª edición revisada (1982), que describe parámetros de farmacocinética tales como las vidas medias t alfa y t beta, y el área bajo la curva (ABC).

Pueden determinarse las vidas medias (t $\frac{1}{2}$  alfa y t $\frac{1}{2}$  beta) y el ABC, a partir de una curva de concentración del ligando en el suero frente al tiempo. Para diseñar la curva puede usarse, por ejemplo, el paquete de análisis WINNONLIN™ (disponible de Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, EE.UU.). En una primera fase (la fase alfa), el ligando está experimentando 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 el suero está disminuyendo a medida que el ligando es eliminado del paciente. La vida media t alfa es la vida media de la primera fase, y la vida media t beta es la vida media de la segunda fase. Por lo tanto, en una realización, la presente descripción proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando según la descripción que tiene una vida media t alfa en el intervalo de 15 minutos o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo 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 alternativamente, un ligando o composición según la descripción tendrá una vida media t alfa en el intervalo de hasta e incluyendo 12 horas. En una realización, el extremo superior del intervalo es 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 horas. Un ejemplo de un intervalo adecuado es 1 a 6 horas, 2 a 5 horas o 3 a 4 horas.

En una realización, la presente descripción proporciona un ligando (polipéptido, dAb o antagonista) o una composición que comprende un ligando según la descripción que tiene una vida media t $\beta$  en el intervalo de aproximadamente 2,5 horas o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas o aproximadamente 12 horas. Además, o alternativamente, un ligando o composición según la descripción tiene una vida media t $\beta$  en el intervalo de hasta e incluidos 21 días. En una realización, el extremo superior del intervalo 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 realización, un ligando o composición según la descripción tendrá una vida media t $\beta$  en el intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 60 horas. En otra

realización, estará comprendido en el intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 48 horas. En otra realización más, estará en el intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 horas.

- Además, o alternativamente a los criterios anteriores, la presente descripción proporciona un ligando o composición que comprende un ligando según la descripción que tiene un valor de ABC (área bajo la curva) en el intervalo de aproximadamente 1 mg•min/ml o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 100, aproximadamente 200 o aproximadamente 300 mg•min/ml. Además, o alternativamente, un ligando o composición según la descripción tiene un ABC en el intervalo de hasta aproximadamente 600 mg•min/ml. En una realización, el extremo superior del intervalo es aproximadamente 500, aproximadamente 400, aproximadamente 300, aproximadamente 200, aproximadamente 150, aproximadamente 100, aproximadamente 75 o aproximadamente 50 mg•min/ml. En una realización, un ligando según la descripción tendrá un ABC en el intervalo seleccionado del grupo que consiste en 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.
- 15 Los polipéptidos y dAb de la descripción y los antagonistas que comprenden éstos, pueden ser formateados para que tengan un tamaño hidrodinámico mayor, por ejemplo, mediante el enlace a un grupo de PEG, albúmina de suero, transferrina, receptor de transferrina o al menos la parte de la unión a transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo, o por conjugación a un dominio de anticuerpo. Por ejemplo, polipéptidos dAb y antagonistas formateados como un fragmento mayor de unión al antígeno de un anticuerpo, o como un anticuerpo (p. ej., formateados como un Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, IgG o scFv).

- Como se emplea en esta memoria, "tamaño hidrodinámico" se refiere al tamaño aparente de una molécula (p. ej., 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 procesarse hasta obtener un tamaño aparente de la proteína, en donde el tamaño viene dado por el "radio de Stokes" o "radio hidrodinámico" de la partícula de proteína.
- 25 El "tamaño hidrodinámico" de una proteína depende tanto de la masa como de la forma (configuración), de modo que dos proteínas que tienen la misma masa molecular pueden tener diferentes tamaños hidrodinámicos en base a la configuración general de la proteína.

- El tamaño hidrodinámico de los ligandos (p. ej., monómeros y polímeros de dAb) de la descripción puede determinarse empleando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de filtración en gel para determinar el tamaño hidrodinámico de un ligando. Matrices de filtración en gel adecuadas para determinar los tamaños hidrodinámicos de los ligandos, tales como matrices de agarosa reticuladas, son bien conocidas y están fácilmente disponibles.

- El tamaño del formato de un ligando (p. ej., el tamaño de un grupo PEG unido a un monómero de dAb) puede variarse, dependiendo de la aplicación deseada. Por ejemplo, cuando se pretende que el ligando abandone la circulación y entre en los tejidos periféricos, es deseable mantener bajo el tamaño hidrodinámico del ligando para facilitar el extravasado del torrente sanguíneo. Alternativamente, cuando se desea que el ligando permanezca en la circulación general durante un período más largo, el tamaño del ligando puede aumentarse, por ejemplo, formateando como una proteína tipo Ig.

- Prolongación de la vida media eligiendo como objetivo un antígeno o epítipo que aumenta la vida media *in vivo*: El tamaño hidrodinámico de un ligando y su vida media en el suero, puede aumentarse también por conjugación o asociación con un polipéptido que se une al TGFbetaRII, dAb o ligando de la descripción con un dominio de unión (p. ej., anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno o epítipo que aumenta la vida media *in vivo*, como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, el agente de unión al TGFbetaRII (p. ej., polipéptido) puede conjugarse o unirse con un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de receptor de Fc anti-neonatal o de albúmina anti-suero, p. ej., un dAb de receptor de Fc anti-AS o anti-neonatal, Fab, Fab' o scFv, o con un aficuerpo de receptor de Fc anti-neonatal o aficuerpo anti-AS o un avímero anti-AS, o un dominio de unión anti-AS que comprende un andamiaje seleccionado de, pero no limitado a, el grupo que consiste en CTLA-4, lipocalina, SpA, un aficuerpo, un avímero, GroEl y fibronectina (véase el documento WO2008096158 para una descripción de estos dominios de unión). La conjugación se refiere a una composición que comprende polipéptido, dAb o antagonista de la descripción que está unido (por enlace covalente o no) a un dominio de unión tal como un dominio de unión que se une a albúmina de suero.

- Generalmente, un polipéptido que mejora la vida media en el suero *in vivo* es un polipéptido de origen natural *in vivo*, y que resiste la degradación o eliminación por mecanismos endógenos que eliminan el material no deseado del organismo (p. ej., humano). Por ejemplo, un polipéptido que aumenta la vida media en el 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 nervioso, 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. En el documento WO2008/096158 se describen, por ejemplo, polipéptidos adecuados.

Dicho método puede emplearse también para la administración dirigida de un dominio variable único, polipéptido o

ligando según la descripción, hacia un tejido de interés. En una realización, se proporciona la administración dirigida de un dominio variable único de alta afinidad según la descripción.

dAb que se unen a albúmina de suero: La descripción en una realización proporciona un polipéptido o antagonista (p. ej., ligando específico doble que comprende un dAb anti-TGFbetaR11 (un primer dAb)) que se une al TGFbetaR11, y un segundo dAb que se une a la albúmina de suero (AS), uniéndose a la AS el segundo dAb. Detalles de ligandos específicos dobles se encuentran en los documentos WO03002609, WO04003019, WO2008096158 y WO04058821.

En determinadas realizaciones de los ligandos y antagonistas, el dAb se une a la albúmina de suero humano y compete por la unión a la albúmina, con un dAb seleccionado del grupo que consiste en cualquiera de las secuencias de dAb descritas en el documento WO2004003019, cualquiera de las secuencias de dAb descritas en el documento WO2007080392, cualquiera de las secuencias de dAb descritas en el documento WO2008096158.

En determinadas realizaciones, 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 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 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 dAb. En determinadas realizaciones, 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 dAb.

En realizaciones más específicas, el dAb es un dAb de V<sub>K</sub> que se une a la albúmina de suero humano. En realizaciones más específicas, el dAb es un dAb de V<sub>H</sub> que se une a la albúmina de suero humano.

V<sub>HH</sub> de camélido adecuados que se unen a la albúmina de suero incluyen los descritos en el documento WO2004041862 (Ablynx N.V.) y en el documento WO2007080392. En determinadas realizaciones, el V<sub>HH</sub> de camélido 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 aquellas secuencias descritas en el documento WO2007080392 o una cualquiera de las SEQ ID n° 518 a n° 534, correspondiendo estos números de secuencia a los citados en los documentos WO2007080392 o WO 2004041862.

En una realización alternativa, el antagonista o ligando comprende un grupo de unión específico para el TGFbetaR11 (p. ej., el TGFbetaR11 humano), en donde la porción comprende secuencias no de inmunoglobulina como se describe en el documento WO2008096158.

Conjugación con un grupo que prolonga la vida media (p. ej., albúmina): En una realización, un (una o más) grupo que prolonga la vida media (p. ej., albúmina, transferrina y uno de sus fragmentos y análogos) está conjugado o asociado con el polipéptido que se une al TGFbetaR11, 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 TGFbetaR11 se describen en el documento WO2005077042.

Otros ejemplos de albúmina, fragmentos y análogos adecuados para su uso en un formato de unión al TGFbetaR11 se describen en el documento WO 03076567.

Cuando un (uno o más) grupo que prolonga la vida media (p. ej., albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de la misma) se usa para formatear los polipéptidos que se unen al TGFbetaR11, dAb y antagonistas de la descripción, pueden conjugarse usando cualquier método adecuado, tal como, mediante fusión directa con el grupo que se une al TGFbetaR11 (p. ej., dAb anti-TGFbetaR11), por ejemplo, utilizando un montaje de nucleótido único que codifica una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión es codificada como una cadena de un solo polipéptido con el grupo que prolonga la vida media situado en el terminal N o C al grupo que se une al TGFbetaR11. Alternativamente, puede lograrse la conjugación usando un enlazador de péptidos entre los grupos, p. ej., un enlazador de péptidos como se describe en los documentos WO03076567 o WO2004003019.

Conjugación con PEG: En otras realizaciones, el grupo que prolonga la vida media es un grupo polietilenglicol. En una realización, el antagonista comprende (opcionalmente consiste en) un dominio variable único de la descripción unido a un grupo polietilenglicol (opcionalmente, en donde dicho grupo 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 dAb y grupos de unión. En una realización, el antagonista consiste en un monómero de dAb unido a un PEG, en donde el monómero de dAb es un dominio variable único según la descripción.

- 5 En otra realización, un dominio variable único, ligando o polipéptido según la descripción, puede unirse a un resto de toxina o toxina.

Resistencia a las proteasas: Los dominios variables únicos, polipéptidos o ligandos según la descripción, pueden modificarse para mejorar su resistencia a la degradación por proteasas. Como se emplea en esta memoria, un péptido o polipéptido (p. ej., un anticuerpo de dominio (dAb)) que es "resistente a la degradación por proteasas", no es degradado sustancialmente por una proteasa cuando se incuba con la proteasa en condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa. Un polipéptido (p. ej., un dAb) no se degrada sustancialmente 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 durante 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 empleando cualquier método adecuado, por ejemplo, por SDS-PAGE o por análisis funcional (p. ej., unión al ligando), como se describe en la presente memoria.

Métodos para generar dAb con resistencia aumentada a las proteasas se describen, por ejemplo, en el documento WO2008149143. En una realización, el dominio variable único, polipéptido o ligando según la descripción, es resistente a la degradación por leucosina 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 (p. ej., carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, elastasa, leucosina, pancreatina, trombina, plasmina, catepsinas (p. ej., catepsina G), proteinasa (p. ej., proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimosina, enteropeptidasa, caspasa (p. ej., caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficina, clostripaína, actinidaina, bromelaína y separasa. En realizaciones específicas, la proteasa es tripsina, elastasa o leucosina. La proteasa puede proporcionarse también por un extracto biológico, homogeneizado biológico o preparado biológico. Los polipéptidos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y ligandos como se describe en la presente memoria, pueden seleccionarse en presencia de proteasas pulmonares, de modo que dichos polipéptidos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y ligandos sean resistentes a dichas proteasas pulmonares. En una realización, la proteasa es una proteasa encontrada en el esputo, moco (p. ej., moco gástrico, moco nasal, moco bronquial), lavado broncoalveolar, homogeneizado de pulmón, extracto de pulmón, extracto pancreático, fluido gástrico o saliva. En una realización, la proteasa es la encontrada en los ojos y/o las lágrimas. Ejemplos de dichas proteasas encontradas en el ojo incluyen caspasas, calpains, metaloproteasas de matriz, desintegrina, metaloproteinasas (p. ej. ADAMs – una desintegrina y metaloproteinasas) y ADAM con motivos de trombospondina, los proteosomas, activador de plasminógeno histórico, secretasas, catepsina B y D, cistatina C, serina proteasa PRSS1 y vía del proteosoma de ubiquitina (UPP). En una realización, la proteasa es una proteasa no bacteriana. En una realización, la proteasa es una proteasa de animal, p. ej., mamífero, p. ej., humano. En una realización, la proteasa es una proteasa del aparato digestivo, o una proteasa del tejido pulmonar, p. ej., una proteasa del aparato digestivo o una proteasa del tejido pulmonar encontrada en seres humanos. Dicha proteasa listada en la presente memoria puede usarse también en los métodos descritos, por ejemplo, en el documento WO2008149143, que implica la exposición de un repertorio de biblioteca para una proteasa.

Estabilidad: En un aspecto de la descripción, los polipéptidos, dominios variables únicos, dAb, 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 durante 14 días en tampón Britton Robinson o PBS. En una realización, al 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 desaglomerado después de dicha incubación a 37°C. En una realización, al 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 realización, al 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, antagonista o dominio variable, continúa estando desaglomerado después de dicha incubación a 50°C. En una realización, al 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. En una realización, no se observa ningún aglomerado de los polipéptidos, dominios variables o antagonistas después de cualquiera de dichas incubaciones. En una realización, el punto isoeléctrico (pI) del polipéptido o dominio variable se mantiene inalterado o sustancialmente inalterado tras la incubación a 37°C a una concentración de polipéptido o dominio variable de 1 mg/ml en tampón 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 durante 7 días en tampón de Britton Robinson o PBS a un pH de 7 a 7,5 (p. ej., a pH 7 o pH 7,5). En una realización, 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 continúa estando desaglomerado después de dicha incubación. En una realización, 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 realización, no se observa ningún aglomerado de los polipéptidos, dominios variables o antagonistas después de cualquiera de dichas incubaciones.

En un aspecto de la descripción, los polipéptidos, dominios variables, antagonistas, composiciones o formulaciones de la descripción, son sustancialmente estables después de nebulización (p. ej., a una concentración de polipéptido o dominio variable de 40 mg/ml) p. ej., a temperatura ambiente, 20°C o 37°C, durante 1 hora, p. ej. con un nebulizador a chorro, p. ej., en una copa Pari LC+. En una realización, 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 desaglomerado después de dicha nebulización. En una realización, 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 o dominio variable, continúa siendo monomérico después de dicha nebulización. En una realización, no se observa ningún aglomerado de los polipéptidos, dominios variables o antagonistas, después de dicha nebulización.

Forma monomérica: En una realización, se identifica que el dAb de la presente descripción es preferentemente monomérico. Propiamente, la descripción proporciona un monómero (sustancialmente) puro. En una realización, el dAb es un monómero por lo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% puro o 100% puro. Para determinar si los dAb son monoméricos o forman oligómeros de orden superior en solución, pueden analizarse por SEC-MALLS. 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, que es bien conocida por los expertos en la técnica. En resumen, las proteínas (a concentración de 1 mg/ml en tampón de PBS de Dulbecco) se separan según sus propiedades hidrodinámicas, por cromatografía de exclusión por tamaño (columna: TSK3000; S200). Después de la separación, la propensión de la proteína a dispersar la luz se mide 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 en función del ángulo. Esta medición tomada junto con la concentración de proteína determinada usando el detector de índice de refracción (IR), permite el cálculo de la masa molar usando ecuaciones apropiadas (parte integral del programa informático de análisis Astra v.5.3.4.12).

Uso terapéutico: La descripción proporciona un método para el tratamiento, supresión o prevención de enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta. En una realización, dicha enfermedad puede ser causada o contribuida por la señalización desregulada del TGFbeta, por la sobreexpresión del TGFbeta, o por las altas concentraciones del TGFbeta biodisponible. Enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades relacionadas con la fibrosis de varios tejidos, tales como fibrosis pulmonar incluidas la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y otra enfermedad pulmonar intersticial tal como el síndrome del dolor respiratorio agudo (SDRA), fibrosis del hígado incluidas la cirrosis y la hepatitis crónica, artritis reumatoide, trastornos oculares, afecciones vasculares tales como restenosis, fibrosis de la piel incluidos 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 nefroesclerosis, o una afección vascular tal como restenosis. Otras enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades vasculares tales como hipertensión, preeclampsia, telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (THH1), THH2, hipertensión arterial pulmonar, aneurismas aórticos, síndrome de Marfan, trastorno de aneurisma familiar, síndrome de Loeys-Dietz y síndrome de tortuosidad arterial (STA). Otras enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta incluyen enfermedades del sistema musculoesquelético tales como la distrofia muscular de Duchenne y la fibrosis muscular. Otras enfermedades relacionadas con la señalización del TGFbeta incluyen el cáncer tal como el cáncer de colon, gástrico y pancreático, así como glioma y NSCLC. Además, la descripción proporciona métodos para elegir como objetivo el cáncer, por ejemplo, modulando la señalización del TGFbeta en la angiogenia tumoral o mediante el tratamiento del estroma canceroso. Otras enfermedades o afecciones 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 (p. ej., hepatitis vírica, por alcohol, por obesidad, autoinmunitaria, metabólica, obstructiva), enfermedades renales incluida la insuficiencia renal (p. ej. 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 colágeno que causa crecimiento excesivo, cicatrización y/o endurecimiento de los tejidos.

"Fibrosis de la piel": La fibrosis cutánea abarca una variedad de trastornos humanos con diferente etiología, pero con una desregulación 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 afección, son el resultado de la cicatrización después de la curación de la herida, con queloides extendiéndose 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 general, que es una

enfermedad general que da lugar a fibrosis de múltiples órganos. En una realización, el dominio variable, ligando, proteína de fusión o polipéptido como se describe en la presente memoria, se usa para prevenir o tratar la enfermedad queloide, las cicatrices hipertróficas o la esclerodermia.

5 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 sensibles y, a diferencia de las cicatrices normales, no retroceden. Predominantemente observada en los pacientes con piel de pigmentación oscura, la “enfermedad queloide” es un tumor fibroproliferante dérmico benigno exclusivo de las personas que nunca se vuelve maligno.

10 La “contractura de Dupuytren” es una formación localizada de tejido cicatricial bajo la piel de la palma de la mano. La cicatrización se acumula en un tejido (fascia) que normalmente cubre los tendones que tiran de los dedos para el agarre. A medida que la contractura de Dupuytren evoluciona, una mayor parte de la fascia se vuelve gruesa y se acorta, dando lugar a la contractura de la mano por flexión donde los dedos se doblan hacia la palma de la mano y no pueden extenderse (enderezarse) complemente, dando lugar en casos extremos a la pérdida del uso de la mano.

15 La cicatrización se produce después de cirugía, lesión o traumatismo de tejidos u órganos en el cuerpo. Es una consecuencia de los mecanismos de reparación que hacen que la matriz extracelular reemplace el tejido normal que falta. La piel representa el tejido lesionado con más frecuencia, lo que da lugar a la cicatrización dérmica, que puede producir consecuencias adversas como por ejemplo: pérdida de la función; contractura; y estética precaria que puede producir efectos psicológicos a quien la padece. Las cicatrices pueden definirse como “una alteración  
20 macroscópica de la estructura y función normales de la contextura de la piel, resultante del producto final de la cicatrización de la herida” (Fergusson *et al.*, 1996). Actualmente, no existen tratamientos para prevenir o mejorar eficazmente la cicatrización.

25 Se ha observado la función del TGFbeta en la fibrosis pulmonar (Wynn *et al.*, *J. Pathology* 2008, 214, págs. 199-210; Sime *et al.*, *J. Clinical Immunology* 1997, vol. 100, págs. 768-776). Se observa un cambio en el aumento de producción de citocinas Th2 y en la disminución de la producción de citocinas Th1, como resultado de una lesión pulmonar desconocida. La sobreexpresión del TGFbeta estimula la angiogenia, la activación de los fibroblastos, la deposición de la MEC y la fibrogenia. Los modelos animales (p. ej., sobreexpresión del TGFbeta, SMAD3 KO, inhibición de la señalización del TGFbetaR), demuestran que el TGFbeta es un mediador clave para el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

30 La “fibrosis pulmonar idiopática (FPI)”, es una enfermedad crónica y evolutiva que da lugar a deposición anormal y excesiva de tejido fibrótico en el intersticio pulmonar sin una causa conocida. Existe una frecuencia de aproximadamente 10 a 20 casos por cada 100.000 en los Estados Unidos al año. La frecuencia aumenta fuertemente con la edad, alcanzando 175 casos por cada 100.000 a la edad de 75 años comenzando normalmente entre los 50 y 70 años. La tasa de supervivencia quinquenal es del 20% con una supervivencia media de 2,8 años.

35 Los síntomas incluyen una tos seca y falta de aliento evolutiva, radiografías anormales del tórax o HRCT y volúmenes pulmonares reducidos. Los tratamientos actuales incluyen corticosteroides (Prednisona), inmunosupresores (ciclofosfamida) o trasplante, aunque ninguna de los tratamientos actualmente disponibles tiene una eficacia demostrada. En una realización, el dominio variable único o polipéptido de la presente descripción proporciona un tratamiento para la FPI.

40 Propiamente, un tratamiento logrado para la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) mostrará cualquiera de una disminución en la proliferación de fibroblastos del pulmón, un aumento de la apoptosis de fibroblastos del pulmón, una disminución en la síntesis y deposición excesivas de la matriz extracelular o un aumento de la degradación y reconstrucción de la matriz extracelular, o mostrará cierta protección contra la lesión del tejido en curso y restauración de la histopatología normal.

45 Propiamente, un tratamiento logrado desaceleraría la evolución de la enfermedad.

La eficacia de un tratamiento para la FPI puede demostrarse en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. En una realización, el dominio variable único 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.

50 El TGFbeta es una importante molécula de señalización celular en la modulación del comportamiento celular en tejidos oculares. La sobreactivación del TGFbeta está implicada en la patogenia de enfermedades fibróticas en el tejido ocular, la cual puede estar relacionada con la cicatrización de heridas y llevar a visión deteriorada y homeostasis del tejido ocular (examinado, por ejemplo, por Saika, *Laboratory Investigation* (2006), 86, 106-115).

55 Por consiguiente, en una realización, las enfermedades relacionadas 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, la conjuntiva, el cristalino o la retina. Los trastornos oculares incluyen la vitreorretinopatía proliferativa (VRP), un trastorno de posdesprendimiento retiniano y fibrosis retiniana, retinopatía diabética, glaucoma, tal como glaucoma de ángulo abierto, glaucoma de ángulo cerrado, síndrome congénito y de pseudoexfoliación,

reacciones de cicatrización de la herida en el cristalino, tal como quemadura posquímica o térmica, o síndrome de Stevens-Johnson, y complicaciones de cataratas tras la intervención quirúrgica. El TGFbeta tiene también una función en el desarrollo de cataratas (Wormstone *et al. Exp. Eye Res.*; 83 1238-1245, 2006). Muchos trastornos oculares ocurren como resultado de fibrosis después de la intervención quirúrgica. Además, se cree que la actividad excesiva del TGFbeta2 (factor de crecimiento transformante  $\beta$ 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 incluidos 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 salida acuosa normal que lleva a presión intraocular elevada y riesgo de desarrollo de glaucoma. Se ha mostrado que el TGFbeta 2 es un agente patológico en modelos preclínicos de glaucoma. Las concentraciones del TGFbeta2 son elevadas en los pacientes con glaucoma, y el tratamiento *in vitro* de células huTM con el TGFbeta-2, lleva a cambios fenotípicos y aumento de las proteínas que modulan la MEC (MMP-2, 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, págs. 1229-1236; Fuchshofer *et al* (2003), *Experimental Eye Research*, vol. 77, emisión 6, págs. 757-765; Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) cartel de la conferencia nº 1631 2009). Además, la sobreexpresión del TGFbeta en el ojo, lleva a una patología tipo glaucoma en ratones (ARVO, cartel de conferencia nº 5108 2009) y se ha demostrado que la administración del TGFbeta-2 usando AAV, inhibe la pérdida de células ganglionares retinianas en un modelo de glaucoma de rata (ARVO, cartel de conferencia nº 5510 2009). Más recientemente, se ha mostrado que la inducción de estrés oxidativo en los astrocitos cultivados de la cabeza del nervio óptico humano, aumentan la secreción del TGFbeta2 (Yu *et al* (2009) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50: 1707-1717). Todo esto indica que la reducción de las concentraciones 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 las concentraciones elevadas de TGFbeta2 más que un tratamiento de choque completo, puede preferirse en el tratamiento de afecciones oculares crónicas tales como el glaucoma. Por consiguiente, enfermedades que pueden tratarse usando los dAb y composiciones, etc. según la descripción, incluyen la cicatrización después de la intervención quirúrgica de filtración del glaucoma.

Por consiguiente, en un aspecto, se describe un método para el tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad relacionada con la señalización del TGFbeta y, en particular, la señalización desregulada del TGFbeta, que comprende administrar a un mamífero que necesita del mismo, una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, proteína de fusión, dominio variable único, antagonista o composición según la descripción.

En otro aspecto, la descripción proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido, ligando o proteína de fusión según la descripción, para su uso como medicamento. Un medicamento adecuado puede comprender un dominio variable único de inmunoglobulina, etc. según la descripción, formateado como se describe en la presente memoria.

Propiamente, el medicamento es una composición farmacéutica. En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende un polipéptido, dominio variable único, ligando, composición o antagonista según la descripción, y un vehículo, diluyente o excipiente fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición comprende un vehículo para su administración. En realizaciones específicas, el polipéptido, proteína de fusión, dominio variable único, antagonista o composición se administra por administración pulmonar, tal como por inhalación (p. ej., inhalación intrabronquial, intranasal u oral, inhalación intranasal tal como mediante gotas), o mediante administración general (p. ej., administración parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrarterial, intratecal, intraarticular, subcutánea, vaginal o rectal). En otra realización, el polipéptido, dominio variable único, ligando o proteína de fusión o composición según la descripción, se administra al ojo, p. ej., por administración tópica, como colirios, sistema de polímero en partículas, gel o implante, o por inyección intraocular, p. ej., en el humor vítreo. La administración puede ser dirigida a regiones específicas del ojo tales como la superficie del ojo, o los conductos lacrimales o glándulas lacrimales, o a las cámaras anterior o posterior del ojo tal como el humor vítreo). Puede ser también útil si el dominio variable único de inmunoglobulina, composición etc. se administra al ojo junto con un potenciador de penetración ocular, por ejemplo, caprato de sodio o con un potenciador de viscosidad, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En otras realizaciones, el polipéptido, proteína de fusión, dominio variable único, antagonista o composición se administra a la piel, por administración tópica a la superficie de la piel y/o administración a una región dentro de la piel, p. ej., administración intradérmica.

Aunque el órgano más accesible del cuerpo para administración, la barrera más exterior de la piel, la capa córnea (CC), actúa como una barrera limitativa de velocidad para la administración de fármacos. Además, se ha requerido inyección intradérmica para evitar la CC, permitiendo la administración de fármacos en el punto de acción en capas más profundas de la piel. Sin embargo, la administración puede lograrse por otros procedimientos de administración transdérmica. Pueden utilizarse metodologías de formulación para administración, incluidos: potenciadores químicos que alteran la estructura de lípidos de la CC; facilitadores peptídicos que permiten el transporte transfolicular; y la encapsulación en partículas como por ejemplo liposomas, niosomas, etosomas y transferosomas, que se cree facilitan la fluidificación 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 empleado para la administración localizado de fármacos. La iontoforesis permite tanto la administración de moléculas con carga como neutras por

electromigración y electroósmosis, respectivamente. Pueden emplearse microagujas para crear canales micronizados en la piel para superar la CC, permitiendo que las proteínas pasen a través de estos canales a la epidermis inferior. Las microagujas pueden clasificarse en líneas generales en microagujas macizas y huecas. Pueden usarse microagujas macizas para romper la CC, antes de la administración del fármaco, recubierto para permitir la administración a medida que el fármaco se disuelve en las agujas, o soluble permitiendo la liberación del fármaco a medida que se disuelve en las agujas *in situ*. Las microagujas huecas permiten la infusión de una formulación líquida de sustancia farmacéutica. La electroporación, a diferencia de la iontoforesis, requiere voltajes mayores de 50V para alterar la permeabilidad de la piel, con objeto de mejorar la penetración del fármaco. Las metodologías de extirpación térmica y con radiofrecuencia permiten la disolución de la CC mediante calentamiento localizado y extirpación de la CC. En la extirpación térmica, esto tiene lugar después de la aplicación de una alta temperatura durante períodos cortos, mientras que la extirpación por radiofrecuencia implica el empleo de radiofrecuencias, que hacen vibrar los microelectrodos sobre la piel, produciendo calentamiento localizado. La rotura de la CC puede lograrse también mediante abrasión con láser, la aplicación de ondas de ultrasonidos de baja frecuencia (sonoforesis) e inyectores de chorro utilizando altas velocidades que impulsan el fármaco a través de la CC.

Además, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de enfermedades utilizando un polipéptido, dominio variable único, composición, ligando o antagonista según la presente descripción. En una realización, la enfermedad es una fibrosis hística tal como la enfermedad que loide o la contractura de Dupuytren.

En un aspecto de la descripción, el polipéptido, dominio variable único, ligando, composición o antagonista, se proporciona para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad o afección relacionada con la señalización del TGFbeta en un ser humano. En otro aspecto, se proporciona el uso del polipéptido, dominio variable único, composición o antagonista, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección relacionada con la señalización del TGFbeta en un ser humano. En otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección relacionada con la señalización del TGFbeta en un paciente humano, comprendiendo el método administrar el polipéptido, dominio variable único, composición o antagonista, al paciente. La descripción se refiere también a métodos terapéuticos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando de la descripción (p. ej., antagonista o dominio variable único) a un sujeto que lo necesita.

En otras realizaciones, la descripción se refiere a un método para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando de la descripción (p. ej., antagonista o dominio variable único).

La descripción se refiere también a un dispositivo de administración de fármacos que comprende la composición (p. ej., la composición farmacéutica) de la descripción. En algunas realizaciones, el dispositivo de administración de fármacos comprende un gran número de dosis terapéuticamente eficaces de ligando.

En otras realizaciones, el dispositivo de administración de fármacos se selecciona del grupo que consiste en un dispositivo de administración parenteral, un dispositivo de administración intravenosa, un dispositivo de administración intramuscular, un dispositivo de administración intraperitoneal, un dispositivo de administración transdérmica o intradérmica, un dispositivo de administración pulmonar, un dispositivo de administración intrarterial, un dispositivo de administración intratecal, un dispositivo de administración intraarticular, un dispositivo de administración subcutánea, un dispositivo de administración intranasal, un dispositivo de administración ocular, un dispositivo de administración vaginal, un dispositivo de administración rectal, una jeringuilla, un dispositivo de administración transdérmica, un dispositivo de administración intradérmica, una cápsula, un comprimido, un nebulizador, un inhalador, un atomizador, un propulsor de aerosol, un vaporizador, un inhalador de polvo seco, un inhalador dosificador, un pulverizador dosificador, un nebulizador dosificador, un atomizador dosificador y un catéter.

En una realización, el dispositivo de administración de fármacos es un dispositivo de administración transdérmica o intradérmica.

Propiamente, la descripción proporciona un dispositivo de administración pulmonar que contiene un polipéptido, dominio variable único, composición o antagonista según la descripción. El dispositivo puede ser un inhalador o un dispositivo de administración intranasal. Propiamente, el dispositivo de administración pulmonar permite la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un ligando, etc. según la descripción.

En otra realización, la descripción proporciona un dispositivo de administración ocular que contiene un polipéptido, dominio variable único, composición o antagonista según la descripción. Propiamente, el dispositivo de administración ocular permite la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un ligando, etc. según la descripción.

Como se emplea en esta memoria, el término "dosis" se refiere a la 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 (p. ej., ligando que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina que se une al TGFbetaRII) administrado a un sujeto durante a lo largo de un día (24 horas) (dosis diaria), dos días, una semana, dos semanas, tres semanas, o uno o más meses (p. ej., mediante una sola

administración, o mediante dos o más administraciones). El intervalo entre las dosis puede ser cualquier cantidad deseada de tiempo. En una realización determinada, el dominio variable único o polipéptido de la invención se administra en la piel mediante inyección, en particular por administración intradérmica, semanal o quincenalmente o cada 7 a 10 días, por ejemplo, cada 7, 8, 9 o 10 días.

- 5 En una realización, el dominio variable único de la descripción se proporciona como un monómero de dAb, opcionalmente no formateado (p. ej., no PEGilado o de vida media prolongada) o unido a un PEG, opcionalmente como una formulación de polvo seco, opcionalmente para administración a un paciente por inhalación (p. ej., administración pulmonar), opcionalmente para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad pulmonar (p. ej., fibrosis pulmonar idiopática).
- 10 Los ligandos de la descripción proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, el ligando puede adaptarse para que tenga una vida media deseada en el suero *in vivo*. Los anticuerpos de dominio son mucho más pequeños que los anticuerpos convencionales, y pueden administrarse para conseguir mejor penetración en los tejidos que los anticuerpos convencionales. De esta manera, los dAb y los ligandos que comprenden un dAb proporcionan ventajas sobre los anticuerpos convencionales cuando se administran para tratar
- 15 una enfermedad, tal como una enfermedad mediada por la señalización del TGFbeta. En particular, la administración pulmonar de un dAb de la presente descripción para tratar la fibrosis pulmonar idiopática, permite la administración local específica de un inhibidor de señalización del TGFbeta. De manera ventajosa, un monómero de dAb no formateado que se une específicamente al TGFbetaRII y lo inhibe, es bastante pequeño para ser absorbido en el pulmón por administración pulmonar.
- 20 Los ejemplos del documento WO2007085815 proporcionan detalles de pruebas relevantes, formateo y experimentos que pueden aplicarse igualmente a los ligandos de la presente descripción.

La descripción se describe además, sólo a título de ilustración, en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Ejemplo 1. Selección de los dAb que se unen al TGFbetaRII

- 25 Selección de los dAb que se unen al TGFbetaRII de ratón

Selecciones sin tratamiento previo: Se utilizaron bibliotecas de fagos sin tratamiento previo 4G y 6G, bibliotecas de fagos que presentan dominios variables únicos de anticuerpo expresados a partir de la secuencia principal GAS1 (véase el documento WO2005093074) para 4G, y además con preselección con calor/frío para 6G (véase el documento WO04101790). Las secuencias principales DOM23 se aislaron haciendo una panorámica de grupos de

30 las bibliotecas de VH y VK (identificadas como 4G H11-19 y 6G VH2-4 (los dAb de VH) y 4G κ1, 4G κ2 y 6G κ (los dAb de Vκ) contra la proteína híbrida TGF-βRII/Fc recombinada de ratón y humana. Estas proteínas híbridas se obtuvieron por expresión de una secuencia de ADN que codifica los restos de aminoácidos 24 a 159 del dominio extracelular del receptor del TGF-β tipo II humano (Lin, *et al.*, 1992, *Cell* 68: 775-785) fusionado a la región Fc de la IgG1 humana en una estirpe celular de riñón embrionario humano, HEK-F.

- 35 Las proteínas híbridas recombinadas TGF-β RII/Fc de ratón y humanas se biotinilaron empleando el reactivo EZ-LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce, Rockford, EE.UU.) (Henderikx, *et al.*, 2002, Selection of antibodies against biotinylated antigens. Antibody Phage Display: Methods and protocols, Ed. O'Brien y Atkin, Humana Press). Las bibliotecas de fagos se agruparon en seis grupos: 4G κ1 y κ2, 6G κ, 4G H11-13, 4G H14-16, 4G H17-19 y 6G VH2-4. Se agruparon  $1 \times 10^{11}$  fagos por biblioteca.
- 40 Los fagos se bloquearon en leche en polvo MARVEL™ al 2% en solución salina tamponada con fosfato (MPBS) con la adición del fragmento Fc de IgG humana 10 μM (fragmento Fc de IgG natural obtenida de IgG de plasma de mieloma humano, Calbiochem, California, EE.UU., nº de catálogo 401.104) durante una hora. Se incubó TGF-β RII/Fc 200 nM de ratón biotinilado con la mezcla de fago bloqueado y fragmento Fc durante 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación se capturó en DYNAbeads™ de estreptavidina (Dynal, Reino Unido) durante cinco
- 45 minutos. Las perlas se lavaron siete veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato/TWEEN™ al 0,1% (PBST), seguido de un lavado con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). El fago unido al TGF-β RII/Fc de ratón biotinilado se eluyó en 500 μl de 1 mg/ml de tripsina en PBS durante 10 minutos, y se utilizó entonces para infectar 1,75 ml de TG1 de *Escherichia coli* en fase logarítmica durante 30 minutos. Las células se sembraron en placas de agar-agar 2 x TYE (extracto de levadura y triptona) enriquecidas con 15 μg/ml de tetraciclina. Para las rondas de selecciones posteriores, se rasparon las células de las placas y se usaron para
- 50 inocular 50 ml de cultivos 2 x TY (levadura y triptona) + 15 μg/ml de cultivos con tetraciclina, que se cultivaron durante la noche a 37°C para la amplificación del fago.

El fago amplificado se recuperó por centrifugación del cultivo de toda la noche durante 10 minutos a 4.566 g. Se añadieron 40 ml de sobrenadante que contenía al fago amplificado a 10 ml de PEG/NaCl (PEG 8000 al 20% v/p + NaCl 2,5 M), y se incubaron en hielo durante 45 a 60 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 4.566 g para sedimentar el fago precipitado. El sobrenadante se desechó, y el sedimento del fago se volvió a poner en suspensión en 2 ml de glicerol al 15% v/v de glicerol/PBS. La muestra del fago se transfirió a tubos Eppendorf de

2 ml, y se centrifugó durante 10 minutos para eliminar cualquier residuo de células bacterianas restantes. El fago se usó como fago de aporte para la segunda ronda de selección. La segunda ronda de selección se llevó a cabo como se ha descrito para la primera ronda, excepto que se añadieron aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  fagos, y se usó TGF- $\beta$  RII/Fc 200 nM humano o TGF- $\beta$  RII/Fc 20 nM de ratón en las selecciones.

- 5 Los productos de la segunda ronda se clonaron a partir del vector de fago fd, pDOM4 en pDOM10. El vector pDOM4, es un derivado del vector del fago fd en el que la secuencia del péptido señal del *gen III* se sustituye por el péptido señal de la proteína de superficie anclada a glucolípidos (GAS) de levadura. Contiene también una etiqueta *c-myc* entre la secuencia principal y el *gen III*, que vuelve a poner el *gen III* en el marco de lectura. Esta secuencia principal funciona bien en los vectores de presentación de fagos, pero también en otros vectores de expresión
- 10 procarióticos, y puede usarse generalmente. pDOM10 es un vector plásmido diseñado para la expresión soluble de los dAb. Se basa en el vector pUC119, con expresión bajo el control del activador *LacZ*. La expresión de los dAb en el sobrenadante se garantizó mediante la fusión del gen del dAb al péptido señal principal GAS universal (véase el documento WO2005093074) en el extremo terminal N. Además, se anexó una etiqueta FLAG en el extremo terminal C de los dAb.
- 15 La subclonación de los genes de los dAb se llevó a cabo aislando el ADN de pDOM4 de las células infectadas por el fago fd que presenta el dAb seleccionado usando un equipo QIAPREP™ Spin MINIPREP™, según las instrucciones del fabricante (nº de catálogo 27.104, Qiagen). El ADN se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos biotinilados DOM57 (5' TTGCAGGCGTGGCAACAGCG-3' (SEQ ID nº 197) y DOM6 (5'-CACGACGTTGTAACGACGGCC-3' (SEQ ID nº 198)), digeridos con las endonucleasas de restricción Sall y NotI, y ligados con pDOM10 digerido con
- 20 Sall y NotI. Los productos de ligadura se transformaron por electroporación en células HB2151 de *E. coli* y se sembraron en placas con TYE (extracto de levadura y triptona) enriquecidas con 100  $\mu$ g/ml de carbenicilina (TYE-carb). Se seleccionaron y expresaron clones aislados en medio de autoinducción rápida durante la noche (sistema de expresión de proteínas de alto nivel, Novagen) enriquecido con 100  $\mu$ g/ml de carbenicilina en placas de 96 pocillos, cultivadas con agitación a 30°C o 37°C. Estas placas de expresión se centrifugaron entonces a 1.800 g durante 10 minutos. Los clones del dAb que unían al TGF- $\beta$  RII/Fc de ratón y/o humano se identificaron por una
- 25 ELISA y tamiz BIACORE™ (GE HEALTHCARE™) o mediante el tamiz de la prueba de unión MSD (Meso Scale Discovery). Para el ELISA, inmunoplasmas Maxisorp™ de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) se recubrieron con TGF- $\beta$  RII/Fc humano o de ratón durante la noche a 4°C. Se lavaron los pocillos tres veces con PBST y a continuación se bloquearon con TWEEN™ al 1% en PBS (TPBS al 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. El bloqueo se suprimió y se añadió una mezcla 1:1 de TPBS al 1% y el sobrenadante del dAb se añadió durante 1 hora a
- 30 temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con PBST, y se añadió anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal de peroxidasa M2 anti-FLAG, Sigma-Aldrich, Reino Unido) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se revelaron utilizando un sustrato colorimétrico (solución de peroxidasa de micropocillos TMB de 1 componente SUREBLUE™, KPL, Maryland, EE.UU.), y se midió la densidad óptica (DO) a 450 nM, siendo la DO<sub>450</sub> proporcional a la cantidad de anticuerpo de detección unido. Para BIACORE™, los sobrenadantes se
- 35 diluyeron 1:1 en tampón de HBS-EP y se tamizaron en BIACORE™ para la unión a TGF- $\beta$  RII/Fc biotinilado humano y de ratón (chip de AS recubierto con 1500 Ru de hRII-Fc biotinilado y 1550 Ru de mRII-Fc biotinilado, según las recomendaciones del fabricante) (BIACORE™, GE HEALTHCARE™). Se introdujeron las muestras en BIACORE™ a un caudal de 50  $\mu$ l/min.
- 40 Selecciones humanas sin tratamiento previo y detección de las mismas

Selección de dAb que se unen al TGFbetaRII humano

Se llevaron a cabo selecciones sin tratamiento previo como se describió para el TGFbRII de ratón, pero utilizando TGFbRII/Fc 150 y 15 nM humano biotinilado en las rondas uno y dos, respectivamente. Se llevó a cabo una tercera ronda utilizando el mismo método que para la ronda dos, pero con TGFbRII/Fc 1,5 nM humano biotinilado.

- 45 Los productos de la tercera ronda se clonaron a partir del vector del fago fd, pDOM4 en pDOM10. La subclonación de los genes del dAb se llevó a cabo aislando el ADN de pDOM4 de las células infectadas por el fago fd seleccionado que presenta al dAb usando un equipo QIAPREP™ Spin MINIPREP™, según las instrucciones del fabricante (nº de catálogo 27104, Qiagen). El ADN plásmido se digirió con las endonucleasas de restricción Sall y NotI, y la inserción del gen del dAb se ligó con pDOM10 digerido con las endonucleasas de restricción Sall, NotI y
- 50 PstI. Los productos de ligadura se transformaron por electroporación en células HB2151 de *E. coli* y se sembraron en placas de TYE (extracto de levadura y triptona) enriquecidas con 100  $\mu$ g/ml de carbenicilina (TYE-carb). Los clones individuales se seleccionaron y expresaron en placas de 96 pocillos a 250 rpm, 30°C durante 72 horas, en 1 ml/pocillo de medio de autoinducción rápida toda la noche (Novagen) enriquecido con 100  $\mu$ g/ml de carbenicilina. Estas placas se centrifugaron a continuación a 1.800 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes solubles del dAb se
- 55 cribaron para la unión al antígeno en la prueba de unión al TGFbRII MSD combinada con la prueba de determinación de la concentración por polarización fluorescente. El número de enlazadores del TGFbRII humano fue alto, y hubieron de adelantarse muchos clones para su caracterización posterior. Por lo tanto, se secuenció un subgrupo de clones y los que tienen secuencias únicas se caracterizaron más.

Prueba de unión al TGFβRII MSD

Esta prueba se usó para determinar la actividad de unión de los dAb anti-TGFβRII. El antígeno del TGFβRII-Fc se recubrió sobre una placa de MSD, que se bloqueó posteriormente para evitar la unión inespecífica. Se añadieron los sobrenadantes diluidos en serie que contenían al dAb soluble etiquetado con FLAG. Después de la incubación, se lavó la placa, y sólo los dAb que se unieron específicamente al TGFβRII-Fc continuaron unidos a la placa. Los dAb unidos se detectaron con un anticuerpo etiquetado con anti-FLAG rutenilado y tampón de lectura de MSD. Si se determinaba la concentración de los dAb en las diluciones del sobrenadante utilizando el análisis de determinación de la concentración de polarización por fluorescencia, entonces las curvas de unión de la concentración se representaban.

- 5 10 15 20
- 0,5 µl por pocillo de 60 µg/ml del TGFβRII-Fc humano, 60 µg/ml del TGFβRII-Fc de ratón o 60 µg/ml de Fc de IgG1 humana (R&D Systems, número de catálogo 110-HG) se colocaron sobre placas de alta unión MSD (Meso Scale Discovery) de 384 pocillos. Las placas se secaron al aire a temperatura ambiente durante un mínimo de cuatro horas y no por más que toda la noche. Las placas se bloquearon con 50 µl por pocillo de MARVEL™ al 5% en solución salina tamponada Tris (TBS) + TWEEN™ 20 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. El reactivo de bloqueo se retiró de los pocillos sacudiendo las placas. Se preparó una serie de diluciones 1:3 de los sobrenadantes del dAb en medio 2xTY. Los dAb se expresaron en el vector de expresión pDOM10, de modo que la proteína del dAb fuera expresada como una proteína de fusión de FLAG. Se retiró el reactivo de bloqueo, y se transfirieron 10 µl por pocillo de los sobrenadantes del dAb diluidos a las placas MSD bloqueadas. Los sobrenadantes de los dAb se detectaron 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 referencia baja (normalizado a unión de 0%) sin especificidad de unión al TGFβRII, y uno de referencia alta (normalizado a unión de 100%) con alta especificidad de unión al TGFβRII, datos no mostrados.

- 25 30
- Las placas se incubaron con los sobrenadantes del dAb y las muestras de referencia durante una hora a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron tres veces con 50 µl por pocillo de TBS + TWEEN™ al 0,1%. Se añadieron 15 µl/pocillo de anticuerpo anti-FLAG rutenilado a las placas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-FLAG (anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG, Sigma, Reino Unido, número de catálogo F3165) se conjugó 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 todos los pocillos, salvo a los pocillos de referencia del anticuerpo de Fc de IgG1 anti-humano de ratón. En cambio se añadieron 15 µl/pocillo de etiqueta MSD anti-ratón (Meso Scale Discovery, número de catálogo R31AC-1). La etiqueta MSD anti-ratón se diluyó en MARVEL™ a 2% en TBS + TWEEN™ 20 al 0,1% hasta una concentración final de 750 ng/ml. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y se lavaron tres veces con 50 µl por pocillo de TBS + TWEEN™ al 0,1%. Se añadieron 35 µl de 1x tampón de lectura MSD (Meso Scale Discovery) a cada pocillo y las placas se leyeron en un lector MSD Sector 6000 (Meso Scale Discovery).

- 35 40
- Los datos se analizaron usando la base de actividad XC50. Todos los datos se normalizaron a la media de los pocillos de referencia alta y baja en cada placa, con la referencia baja normalizada para la unión de 0%. y la alta referencia normalizada para la unión de 100%. Se aplicó un ajuste de la curva de cuatro parámetros a los datos normalizados, y se representaron gráficamente 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 dAb en el análisis de los sobrenadantes.

El ajuste de cuatro parámetros empleado, fue el siguiente:

$$y = \frac{(a - d)}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d$$

, 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 dAb en la prueba de los sobrenadantes

- 45 50
- Este análisis permite determinar la concentración de los dAb solubles marcados con FLAG expresados en sobrenadantes. Un péptido de FLAG marcado con fluorescencia se mezcló con un anticuerpo anti-FLAG. Las moléculas fluorescentes se excitaron con luz polarizada a una longitud de onda de 531 nM, y la luz polarizada emitida se leyó a una longitud de onda de 595 nM. La adición de un dAb marcado con FLAG dio lugar al desplazamiento del péptido fluorescente procedente del anticuerpo anti-FLAG, lo cual dio lugar a su vez a la polarización reducida de la señal de emisión. Se preparó una curva patrón de concentraciones conocidas del dAb placebo de VH purificado marcado con FLAG, y se usó para volver a calcular la concentración de los dAb solubles en los sobrenadantes. Los datos de la concentración se combinaron con los datos de la actividad de unión, permitiendo representar las curvas de unión de la concentración para los sobrenadantes del dAb.

- 55
- Los sobrenadantes del dAb se diluyeron 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 tamponada con fosfato (PBS). Los sobrenadantes diluidos se transfirieron a una placa negra de 384 pocillos. Se trazó una curva patrón diluyendo en serie el dAb placebo de VH purificado 1:1.7 en medio 2xTY al 10% en v/v en PBS. La concentración más alta del dAb fue de 10 µM, y hubo 16 diluciones en total. 5 µl de cada

dilución se transfirieron a la placa de 384 pocillos. Se preparó una mezcla de péptido FLAG 5 nM marcado en el extremo terminal C 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 tampón de CHAP 2 mM. 5 µl de la mezcla se transfirieron a los pocillos que contenían los dAb diluidos (tanto sobrenadantes como los pocillos de la curva patrón). La placa se centrifugó a 1.000 rpm (216 g) durante 1 minuto y a continuación se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 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 1: BODIPY TMR FP P pol 595

10 Filtro de emisión 2: BODIPY TMR FP P pol 595

Espejo: BODIPY TMR FP Dual Enh.

Se representó la curva patrón y se usó para volver a calcular las concentraciones de los dAb solubles en los sobrenadantes.

Los dAb que se unen al TGF-β RII/Fc de ratón y humano identificados en las pruebas de unión ELISA, BIACORE™ y MSD, se expresaron en medio de autoinducción rápida toda la noche (ONEX™, Novagen) a 30°C durante 48 a 72 horas. Los cultivos se centrifugaron (4.600 rpm durante 30 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), durante la noche a 4°C o a temperatura ambiente durante al menos una hora. Se rellenó con las perlas 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 dAb unidos se eluyeron con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,0, y se neutralizó con Tris 1 M, pH 8,0. Se midió la DO de los dAb 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 dAb.

Se dan a continuación las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de los ejemplos sin tratamiento previo del dAb del TGFRII anti-humano y anti-murino.

25 Secuencia de aminoácidos de Dom23h 802 (SEQ ID nº 1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEGTMTWVVRQAPGKGLEWVSAILAAGSNTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRERDGFYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de Dom23h 802 (SEQ ID nº 39)

30 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTAGTGAGGGGACGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CAGCTATTTTGGCTGCTGGTCTAATACTACGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
AAAGAGGCAGGAGCGGGATGGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de Dom23h 803 (SEQ ID nº 2)

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAGRMWVVRQAPGKGLEWVSAINRDGTRTYADSVKGRFTISRDNK  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHDDGHGNFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de Dom23h 803 (SEQ ID nº 40)

40 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTAGTGCTGGGCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CAGCGATTAATCGGGATGGTACTAGGACATACTACGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
ACATGATGATGGTCATGGTAATTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-813 (SEQ ID nº 3)

45 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTDDRMWVVRQAPGKGLEWVSAIQPDGHTTYADSVKGRFTISRDNK  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEQDVKGSSSFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-813 (SEQ ID nº 41)

50 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTACGGATGATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CAGCTATTCAGCCTGATGGTCATACGACATACTACGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAA

ACAGGATGTTAAGGGGTCGCTTCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-815 (SEQ ID nº 4)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAEDRMWVVRQAPGKGLEWVSAIDPQGQHTYYADSVKGRFTISRDN  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQSTGSATSDYWGGQTLVTVSS

5 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-815 (SEQ ID nº 42)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGCGGAGGATCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CAGCTATTGATCCTCAGGGTCAGCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
10 ACAGTCTACTGGGTCTGCTACGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-828 (SEQ ID nº 5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMSYRMMWVVRQAPGKGLEWVSAISPSGSDTYADSVKGRFTISRDN  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQVVEYSRTHKGVFDYWGGQTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-828 (SEQ ID nº 43)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTATGAGTTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
AGCTATTTCTCCGAGTGGTAGTGATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
CAGGTGGTGGAGTATTCGCGTACTCATAAGGGGTGTGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC  
20 GAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-830 (SEQ ID nº 6)

EVQLLESGGGLVQPGGFLRLSCAASGFTFEGYRMMWVVRQAPGKGLEWVSAIDSLGDRTYADSVKGRFTISRDN  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGLTHQSPSTFDYWGGQTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-830 (SEQ ID nº 44)

25 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCT  
CCGGATTCACCTTTGAGGGGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
AGCTATTGATTCTCTGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
CAGGGGCTTACGCATCAGTCTCCGAGTACTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30 Secuencia de aminoácidos de DOM23h-831 (SEQ ID nº 7)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYKMTWVRQAPGKGLEWVSYITPSGGQTYADSVKGRFTISRDN  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYGSSFDYWGGQTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-831 (SEQ ID nº 45)

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCT  
CCGGATTCACCTTTGAGGCGTATAAGATGACGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTC  
ATATATTACGCCGTCTGGTGGTTCAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
TATGGTTTCGAGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-840 (SEQ ID nº 8)

40 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGDGRMMWVVRQAPGKGLEWVSAIEGAGSDTYADSVKGRFTISRDN  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQASRNSPFYWGGQTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-840 (SEQ ID nº 46)

45 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGGGGATGGTGTATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CAGCTATTGAGGGGGCGGGTTCCGATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACAGGCGTCGCGGAATTCGCCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGGACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## ES 2 627 299 T3

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-842 (SEQ ID nº 9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDSEMAWARQAPGKGLEWVSLIRRNATYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVTKDRSVLFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-842 (SEQ ID nº 47)

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGATGATAGTGAGATGGCGTGGGCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CACTTATTCGGCGTAATGGTAATGCTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
AGTTACGAAGGATCGTTCTGTGCTTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10 Secuencia de aminoácidos de DOM23h-843 (SEQ ID nº 10)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDQDRMWWVRQAPGKGLEWVSAIESGGHRTYYADSVKGRFTISRDNK  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQNESGRSGFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-843 (SEQ ID nº 48)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGATCAGGATCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CAGCTATTGAGAGTGGTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACAGAATGAGTCGGGGCGTTCGGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-850 (SEQ ID nº 11)

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDAARMWWARQAPGKGLEWVSAIADIGNTTYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQSGSEDFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-850 (SEQ ID nº 49)

25 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGATGCGGGTAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGCGGATATTGGTAATACTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
ACAGTCTGGTTTCGGAGGATCATTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-854 (SEQ ID nº 12)

30 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAQDRMWWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQDLHGTSSLFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-854 (SEQ ID nº 50)

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGCTCAGGATCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
ACAGGATTTGCATGGTACTAGTTCTTTGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-855 (SEQ ID nº 13)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFENTSMGWVRQAPGKGLEWVSRIDPKGSHTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRELKSHFDYWGQGLTVTVSS

40 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-855 (SEQ ID nº 51)

45 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGAGAATACGAGTATGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
CACGTATTGATCCTAAGGGTAGTCATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
ACAGCGTGAGTTGGGTAAGTCGCATTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-865 (SEQ ID nº 14)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYEMTWVRQAPGKGLEWVSKIDPSGRFTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRIDLQLFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-865 (SEQ ID nº 52)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTTCGTAGTTATGAGATGACTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
 AAAGATTGATCCTTCGGGTCGTTTTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA  
 5 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
 GGTCGGACGGATCTTCAGCTTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-866 (SEQ ID nº 15)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMRWARQAPGKGLEWVSYITPKGDHTYYADSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAESLHNERVKHFDYWGQGLTVTVSS

10 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-866 (SEQ ID nº 53)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTTCGAATTATTGGATGCGGTGGGCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
 CATATATTACTCCTAAGGGTGATCATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGA  
 15 ATCGCTTCATAATGAGCGTGTTAAGCATTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-874 (SEQ ID nº 16)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYRMWVVRQAPGKGLEWVSVIDSTGSATYYADSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAGSAMGEFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-874 (SEQ ID nº 54)

20 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACTAGTTATCGTATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
 AGTTATTGATTCTACTGGTTCGGCTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA  
 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
 CAGCAGGCTGGGAGTGCGATGGGGGAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

25 Secuencia de aminoácidos de DOM23h-883 (SEQ ID nº 17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVNYRMWVVRQAPGKGLEWVSAISGSGDKTYADSVKGRFTISRDNK  
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGLSFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-883 (SEQ ID nº 55)

30 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTGTTAATTATCGTATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
 AGCTATTAGTGGTAGTGGTGATAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA  
 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
 CATGGGCTGTCGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-903 (SEQ ID nº 18)

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDMRMWWVRQAPGKGLEWVSVINADGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGLPFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-903 (SEQ ID nº 56)

40 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTAATGATATGAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
 CAGTGATTAATGCTGATGGTAATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 AGATGGGCTGCCTTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-4 (SEQ ID nº 19)

45 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYGMGWVVRQAPGKGLEWVSWIEKTGNKTYADSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGRHIKVRSRDFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-4 (SEQ ID nº 57)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGACTTATGGTATGGGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
 ATGGATTGAGAAGACGGGTAATAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA

ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
GCGGGGAGGCATATTAAGGTGCGTTTCGAGGGATTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA  
GC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-29 (SEQ ID nº 20)

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKRYSMGWVRQAPGKGLEWVSVINDLGLSLYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNISMVRPGSWFDYWGGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-29 (SEQ ID nº 58)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTACCTTTAAGAGGTATTCTATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
10 AGTTATTAATGATCTGGGTAGTTTGCATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
GGGAATATTAGTATGGTGAGGCCGGGGAGTTGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA  
GC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-32 (SEQ ID nº 21)

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFFEYPMGWVRQAPGKGLEWVSVISGDGQRTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSHGTVRHLETFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-32 (SEQ ID nº 59)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTACCTTTTTGAGTATCCTATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
20 AGTTATTAGTGGGGATGGTCAGCGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
AAGTCATACGGGGACTGTGAGGCATCTGGAGACGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG  
AGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-62 (SEQ ID nº 22)

25 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQESMYWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGTRIKQGFYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-62 (SEQ ID nº 60)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTACCTTTTGGTCAGGAGAGTATGTATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
30 CAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
AAGTGGTACGCGGATTAAGCAGGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-71 (SEQ ID nº 23)

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMDYRMYWVRQAPGKGLEWVSGIDPTGLRYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIKWGEMGSYKTFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-71 (SEQ ID nº 61)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTACCTTTATGGATTATAGGATGTATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
AGGGATTGATCCTACTGGTTTGCAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA  
40 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA  
ATTAAGTGGGGGGAGATGGGGAGTTATAAGACTTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA  
GC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-72 (SEQ ID nº 24)

45 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMDYDMSWVRQAPGKGLEWVSMIREDDGGKTYADSVKGRFTISRDNK  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARVPYRRGHRDNFDYWGGTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-72 (SEQ ID nº 62)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTACCTTTATGGATTATGATATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
AATGATTCGTGAGGATGGTGGTAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA  
50 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA

GCGAGGGTGCCTTATCGGCGTGGGCATAGGGATAATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-81 (SEQ ID nº 25)

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEPVIMGWVRQAPGKGLEWVSAIEARGGGTYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPRHLSQDFDYWGQGLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-81 (SEQ ID nº 63)

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCTT  
CCGGATTCACCTTTGAGCCGTTATTATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
AGCTATTGAGGCGCGGGTGGGGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGTATATTACTGTGCGA  
AACCTGGGCGGCATCTTAGTCAGGATTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-99 (SEQ ID nº 26)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTRYRMMWVRQAPGKGLEWVSTIDPAGMLTYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRLASRSHFDYWGQGLVTVSS

15 Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-99 (SEQ ID nº 64)

20 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGATCGGTATCGTATGATGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC  
AACGATTGATCCTGCTGGTATGCTTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGTATATTACTGTGCGAAA  
AGGCTGGCTTCGCGGAGTCATTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23m-101 (SEQ ID nº 27)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYDMAWVRQAPGKGLEWVSRIRSDGVRTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRKNGWFDYWGQGLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23m-101 (SEQ ID nº 65)

25 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGCGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTTCTGAGTATGATATGGCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTTGGAGTGGGTCTC  
ACGGATTGTTCTGATGGTGTAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGTATATTACTGTGCGAAA  
GATCGTGCTAAGAAATGGTTGGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30 Secuencia de aminoácidos de DOM23h-352 (SEQ ID nº 28)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYKMAWVRQAPGKGLEWVSLIFPNGVPTYANSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYSQGRDFDYWGQGLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-352 (SEQ ID nº 66)

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGATAAGTATAAGATGGCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTC  
ACTTATTTTCCGAATGGTGTTCCTACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAA  
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGTATATTACTGTGCGAAAT  
ATAGTGGTCAGGGGCGGGATTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40 Las CDR definidas por Kabat, de estos ejemplos sin tratamiento previo de dAb del TGFRII anti-humano y anti-  
murino, se muestran respectivamente en las tablas 1 y 2 siguientes.

Tabla 1

Secuencias de CDR de los dAb del TGFβRII anti-humano

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
DOM23h-802	SEGMTMW (SEQ ID nº 77)	AILAAGSNTYYADSVKG (SEQ ID nº 113)	KRQERDGFY (SEQ ID nº 149)

ES 2 627 299 T3

DOM23h-803	SAGRMW (SEQ ID n° 78)	AIRNDGTRTYADSVKG (SEQ ID n° 114)	HDDGHGNFDY (SEQ ID n° 150)
DOM23h-813	TDDRMW (SEQ ID n° 79)	AIQPDGHTTYADSVKG (SEQ ID n° 115)	EQDVKGSSSFDY (SEQ ID n° 151)
DOM23h-815	AEDRMW (SEQ ID n° 80)	AIDPQQHTTYADSVKG (SEQ ID n° 116)	QSTGSATSDY (SEQ ID n° 152)
DOM23h-828	MSYMRW (SEQ ID n° 81)	AISPSGSDTYADSVKG (SEQ ID n° 117)	QVVEYSRTHKGVFDY (SEQ ID n° 153)
DOM23h-830	EGYRMW (SEQ ID n° 82)	AIDSLGDRTYADSVKG (SEQ ID n° 118)	QGLTHQSPSTFDY (SEQ ID n° 154)
DOM23h-831	EAYKMT (SEQ ID n° 83)	YITPSGGQTYADSVKG (SEQ ID n° 119)	YGSSFDY (SEQ ID n° 155)
DOM23h-840	GDGRMW (SEQ ID n° 84)	AIEGAGSDTYADSVKG (SEQ ID n° 120)	QASRNSPFDY (SEQ ID n° 156)
DOM23h-842	DDSEMA (SEQ ID n° 85)	LIRRNNGATYYADSVKG (SEQ ID n° 121)	VTKDRSVLFDY (SEQ ID n° 157)
DOM23h-843	DQDRMW (SEQ ID n° 86)	AIESGGHRTYYADSVKG (SEQ ID n° 122)	QNESGRSGFDY (SEQ ID n° 158)
DOM23h-850	DAARMW (SEQ ID n° 87)	AIADIGNTTYADSVKG (SEQ ID n° 123)	QSGSEDHFDY (SEQ ID n° 159)
DOM23h-854	AQDRMW (SEQ ID n° 88)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID n° 124)	QDLHGTSSLFDY (SEQ ID n° 160)
DOM23h-855	ENTSMG (SEQ ID n° 89)	RIDPKGSHTYYADSVKG (SEQ ID n° 125)	QRELKSHFDY (SEQ ID n° 161)
DOM23h-865	RSYEMT (SEQ ID n° 90)	KIDPSGRFTYYADSVKG (SEQ ID n° 126)	GRTDLQLFDY (SEQ ID n° 162)
DOM23h-866	SNYWMR (SEQ ID n° 91)	YITPKGDHTTYADSVKG (SEQ ID n° 127)	SLHNERVKHFDY (SEQ ID n° 163)
DOM23h-874	TSYRMW (SEQ ID n° 92)	VIDSTGSATYYADSVKG (SEQ ID n° 128)	QQAGSAMGEFDY (SEQ ID n° 164)
DOM23h-883	VNYRMW (SEQ ID n° 93)	AISGSGDKTYADSVKG (SEQ ID n° 129)	HGLSFDY (SEQ ID n° 165)
DOM23h-903	NDMRMW (SEQ ID n° 94)	VINADGNRTYYADSVKG (SEQ ID n° 130)	DGLPFDY (SEQ ID n° 166)

Tabla 2

Secuencias de la CDR de los dAb del TGF $\beta$ RII anti-murino

Clon	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	MDYRMY (SEQ ID nº 99)	GIDPTGLRYYADSVKG (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)	LIFPNGVPTYANSVKG (SEQ ID nº 140)	YSGQGRDFDY (SEQ ID nº 176)

Ejemplo 2. DSC (calorimetría de barrido diferencial) – clones sin tratamiento previo

- 5 Se determinó la estabilidad térmica de los dAb utilizando calorimetría de barrido diferencial (DSC). Los dAb se dializaron durante la noche en PBS hasta una concentración final de 1 mg/ml. El tampón de diálisis se utilizó como referencia para todas las muestras. Se llevaron a cabo mediciones de DSC usando el microcalorímetro de celda capilar GE HEALTHCARE™-MICROCAL™VP-DSC, a un ritmo de calentamiento de 180°C/hora. Un intervalo de exploración típico fue de 20 a 90°C tanto para el tampón de referencia como para la muestra de proteína. Una nueva exploración se llevó a cabo cada vez para evaluar el grado de repliegamiento de la proteína en estas condiciones experimentales. Después de la exploración de cada muestra de proteína, la celda capilar se limpió con una solución de DECON™ al 5% (Fisher-Scientific) en agua, seguido de una exploración de la PBS. Los vestigios de los datos resultantes se analizaron usando el programa informático Origin 7.0. Los vestigios de la DSC obtenidos a partir de la exploración del tampón de referencia se sustrajeron de los de la exploración de la muestra de proteína. La concentración molar precisa de la muestra de proteína se ingresó en la rutina del análisis de datos para dar valores de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), entalpía ( $\Delta H$ ) y entalpía de Van't Hoff ( $\Delta H_v$ ). Los datos se ajustaron a un modelo que no era de 2 estados (N2M). El mejor ajuste se obtuvo con 1 o 2 casos de la transición. Los valores de la T<sub>m</sub> obtenidos para los dAb descritos en esta patente oscilan entre 52,1°C y 73,3°C. Los valores de la T<sub>m</sub> y el porcentaje de repliegamiento, se muestran en la tabla 3.

20

Tabla 3

Nombre del dAb	Tm aparente de la DSC °C			% de replegamiento
	transición 1 N2M	transición 2 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

Todas las moléculas mantienen la estructura terciaria hasta por lo menos 52°C tras el calentamiento.

Ejemplo 3. SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz de láser de ángulos múltiples)

5 – clones sin tratamiento previo

- Para determinar si los dAb son monoméricos o forman oligómeros de orden superior en solución, se analizaron por SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz de láser de ángulos múltiples). Un sistema de HPLC serie 1100 de Agilent con un cargador automático de muestras y un detector UV (controlado por el programa informático Empower) se conectó al detector Wyatt Mini Dawn Treos (de dispersión de luz de láser (LS)) y el detector Wyatt Optilab rEX DRI (de índice de refracción (IR) diferencial). Los detectores se conectaron en el siguiente orden -UV-LS-IR. Ambos instrumentos IR y LS operan a una longitud de onda de 658 nm; se controló la señal UV a 280 nm y 220 nm. Se separaron los anticuerpos de dominio (inyección de 100 microlitros a una concentración de 1 mg/ml en PBS), según sus propiedades hidrodinámicas por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna GE HEALTHCARE™ 10/300 Superdex 75. La fase móvil fue PBS más etanol al 10%.
- 10 La intensidad de la luz dispersa mientras la proteína pasaba a través del detector se midió en función del ángulo. Esta medición tomada junto con la concentración de proteína determinada usando el detector IR, permitió el cálculo de la masa molar empleando ecuaciones apropiadas (parte integral del programa informático de análisis Astra v.5.3.4.14). Todos los dAb descritos en la presente memoria tienen un contenido monomérico que oscila entre 65% y 98%. Los datos se muestran en la tabla 4.

15 Tabla 4

Denominación del dAb	Monómero por 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	No determinado
DOM23m-71*	88
DOM23m-72	No determinado
DOM23m-81	No determinado

DOM23m-99	79
DOM23m-101	77,4
DOM23m-352	93

\*Estos dAb se introdujeron usando el mismo montaje que para SEC-MALLS descrito anteriormente, salvo que la HPLC utilizada fue un sistema Shimadzu LC-20AD Prominence. Estos dAb se introdujeron también en una columna Superdex75, pero el tampón de la fase móvil fue PBS.

- 5 Las moléculas listadas en las tablas 3 y 4 se seleccionaron basándose en el contenido en estado en solución (propensión a la monomerización) y la estabilidad térmica. Todas las moléculas presentan una propensión  $\geq 65\%$  a la monomerización, y mantienen la estructura terciaria hasta por lo menos  $52^{\circ}\text{C}$  tras el calentamiento.

Ejemplo 4. Pruebas para la inhibición del TGFbetaRII (clones sin tratamiento previo)

Prueba de la luciferasa MC3T3-E1 – método m1

- 10 La prueba de la luciferasa MC3T3-E1 mide la capacidad de los dAb para inhibir la expresión de la CAGA-luciferasa inducida por el TGF $\beta$  en células MC3T3-E1. Tres copias de un motivo de secuencia sensible al TGF $\beta$ , denominado secuencia CAGA, están presentes en el activador PAI-1 humano y se unen específicamente a las proteínas Smad3 y 4. La clonación de copias múltiples de la secuencia CAGA en una montaje indicador de luciferasa confiere sensibilidad del TGF $\beta$  a las células transfectadas con el sistema indicador. Esta prueba emplea células MC3T3-E1
- 15 (osteoblastos de ratón) transfectadas establemente con un montaje indicador de [CAGA]<sub>12</sub>-luciferasa (Dennler, *et al.* (1998) *EMBO J.* 17, 3091–3100).

Se determinó la capacidad de los dAb solubles para bloquear la señalización del TGF- $\beta$ 1 por la vía Smad3/4.

- El protocolo utilizado para generar los datos que aparecen como método m1 en la tabla 5, es el siguiente. En resumen,  $2,5 \times 10^4$  células MC3T3-E1 por pocillo en medio de ensayo (medio RPMI (Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido), suero de ternera fetal al 10% inactivado con calor, y penicilina al 1 %/estreptomocina), se añadieron a una placa de cultivo hístico de 96 pocillos (Nunc), seguido por el dAb y el TGF- $\beta$ 1 (concentración final de 1 ng/ml) y se incubaron durante seis horas a  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5%. Los dAb se dializaron en PBS antes de ser analizados en la prueba. Se añadió el reactivo de luciferasa BRIGHTGLOW™ (Promega, Reino Unido) a los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante dos minutos para dejar lisar las células, y la luminiscencia resultante se midió en un
- 25 luminómetro.

La prueba se llevó a cabo varias veces para obtener un promedio y el intervalo de valores de inhibiciones en % del máxima se resumen en la tabla 5. Este método se ha modificado y se describe a continuación.

Prueba modificada de luciferasa MC3T3-E1 – método m2

- Se añadieron células MC3T3-E1 a placas de 96 pocillos (Nunc 13610) a  $1,25 \times 10^4$  por pocillo en “medio de siembra”
- 30 (MEM-alfa + ribonucleósidos + desoxirribonucleósidos (Invitrogen 22571), FCS arrastrado con vapor en carbón vegetal al 5% (Perbio Sciences UK Ltd; SH30068.03), 1/100 de piruvato de sodio (Invitrogen 11360), 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de geneticina 50 mg/ml (Invitrogen, 10131027), y se incubaron durante la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5%. El medio de las células se reemplazó con “medio de ensayo” (DMEM (Invitrogen 31966021), Hepes 25 mM (Invitrogen)), y los dAb purificados en PBS a 4x concentración de la prueba final se valoraron en el “medio de ensayo” y se añadieron a las
- 35 placas celulares, seguido del TGF- $\beta$ 1 (R&D, 240B) a 4x la EC80. Las placas se incubaron durante seis horas a  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5%. Se añadió reactivo de luciferasa STEADYLITE™ (PerkinElmer 6016987) a los pocillos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se midió la luminiscencia resultante en el lector de placas ENVISION™.

- Cada dAb se valoró por duplicado en un análisis y se determinó un % de inhibición máxima (n=2). El análisis se
- 40 llevó a cabo veces múltiples para obtener un promedio y el intervalo de valores de las inhibiciones en % del máximo que se resumen en la tabla 5. Se reunieron los parámetros de QC del análisis; pequeña molécula interna que muestra un intervalo de CI50 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- $\beta$  estuvo comprendida dentro de 6 veces de la concentración añadida a la prueba.

- 45 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 dAb para inhibir la liberación de IL-11 estimulada por el TGF- $\beta$ 1 humano de células A549. El TGF- $\beta$ 1 se une directamente al TGF- $\beta$ RII e induce el montaje del complejo TGF- $\beta$ RI/II. El TGF- $\beta$ RI se fosforila y es capaz de señalizar por varias vías incluida la vía Smad4. La activación de la vía Smad4 da lugar a la liberación de IL-11. La IL-11 se segrega en el
- 50 sobrenadante celular y se mide a continuación por ELISA colorimétrico.

Se determinó la capacidad de los dAb solubles para bloquear la señalización del TGF- $\beta$ 1 por la vía Smad4. En resumen,  $1 \times 10^5$  células A549 por pocillo en “medio de ensayo” (medio DMEM de alto contenido en glucosa (Gibco™, Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido), suero de ternera fetal al 10% inactivado por calor (PAA, Austria), HEPES 10 mM (Sigma, Reino Unido) y penicilina al 1%/estreptomina (PAA, Austria)), se añadieron a una placa de cultivo de 5 96 pocillos (Nunc), seguido del dAb y el TGF- $\beta$ 1 (concentración final de 3 ng/ml) (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), y se incubaron durante la noche a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Los dAb se dializaron en PBS antes de ser analizados. Se midió la concentración de IL-11 liberada en el sobrenadante usando un DUOSET™ para IL-11 humana (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), según las instrucciones del fabricante.

Para la prueba de liberación de IL-11 de células A549 remitirse a las tablas 5 y 6 como método analítico h1. La prueba se llevó a cabo varias veces para obtener un promedio y el intervalo de valores de inhibiciones de % del máximo que se resumen en la tabla 5. Se reunieron los parámetros de QC de la prueba: pequeña molécula interna que muestra un intervalo de CI50 de 50 a 500 nM para las pruebas en personas.

#### Prueba del detector de células HEK 293T SBE-bla – h2

Los miembros de la familia Smad de moléculas de transducción de señales son componentes de una vía intracelular que transmite señales del TGF- $\beta$  desde la superficie de la célula al núcleo. El TGF- $\beta$ 1 se une directamente al TGF- $\beta$ RII e induce el montaje del complejo TGF- $\beta$ RII. Smad2 y Smad3 son fosforilados a continuación por el TGF- $\beta$ RI, y forman posteriormente un complejo heteromérico con el miembro de la cofamilia smad, Smad4. Estos complejos son desplazados hacia el núcleo, donde se unen al ADN y regulan la transcripción génica.

Las células HEK 293T del detector de células SBE-bla contienen un gen indicador 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- $\beta$ 1, y pueden usarse para detectar agonistas/antagonistas de la vía de señalización Smad2/3.

Se determinó la capacidad de los dAb solubles para bloquear la señalización del TGF- $\beta$ 1 por esta vía siguiendo el siguiente método, que estaba basado en un método optimizado de Invitrogen, Reino Unido (estirpe celular K1108).

La prueba se llevó a cabo directamente en células congeladas que se habían cultivado durante al menos 4 pasos en medio de cultivo (DMEM de alto contenido en glucosa, Invitrogen 21068028, FBS U.S. al 10% dializado, Invitrogen 26400-044, aminoácidos no esenciales 0,1 mM (1/100), Invitrogen 11140-050, tampón HEPES 25 mM (1/40), Sigma H0887, piruvato de sodio 1 mM (1/100), Invitrogen 11360-070, GLUTAMAX™ al 1% (200 mM, Invitrogen 35050038), 5  $\mu$ g/ml de blasticidina, Invitrogen R21001) y congeladas en la propia empresa (en  $4 \times 10^7$ /ml). Las células se sembraron a razón de 20.000 células por pocillo en placas de cultivo de células (Costar 3712) en medio de siembra (como anteriormente con FCS a 1% y sin blasticidina). Después de incubar las células durante la noche, los dAb purificados se diluyeron en “medio de ensayo” (DMEM (Invitrogen 31966021), Hepes 25 mM (Invitrogen), y se añadieron a las células a 4x concentración de prueba final. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se añadió TGF- $\beta$  (R&D Systems; 240B) a 4x EC80, y se incubó durante otras 5 horas. El substrato LIVEBLAZER™ (Invitrogen K1030) se obtuvo según las instrucciones del fabricante, y se añadió a 8x el volumen. Las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas y se leyeron en el lector de placas ENVISION™, según el protocolo de Invitrogen.

Para la prueba SBE-bla HEK CELLSSENSOR™ se remite a las tablas 5 y 6 como método h2. Cada dAb se valoró por duplicado en un análisis y se determinó una CI50, y la inhibición en % del máximo (n=2). Debido a la dificultad para obtener curvas completas en la prueba en ratones, sólo se citan las inhibiciones en % en la tabla 5. La prueba se llevó a cabo varias veces hasta obtener un promedio y un intervalo de valores que se resumen en las tablas 5 y 6. Se calculó la media aritmética CI50 usando las pCI50 (-log de CI50), y el intervalo calculado añadiendo y sustrayendo el logaritmo de la desviación típica de la pCI50 media, y transformando entonces de nuevo hasta la CI50. Se reunieron los parámetros de QC de la prueba; pequeña molécula interna que presenta un intervalo de CI50 de 50 a 500 nM para las pruebas en personas. Además, los factores Z robustos fueron mayores de 0,4, y la EC80 del TGF- $\beta$  estuvo comprendida dentro de 6 veces la concentración añadida a la prueba.

Los resultados se muestran en las tablas 5 y 6.

Tabla 5

Datos de prueba funcionales en células para clones específicos de ratón más dAb placebo de VH

	Prueba de células 3T3 de ratón				Prueba de liberación de IL-11 humana (h1) o SBE-bla HEK CELLENSOR™ (h2)					
	Método de ensayo	Promedio	D.T.	Intervalo	n	Método de ensayo	Promedio	D.T.	Intervalo	n
DOM23m-04	m1	<b>73,3</b>	8,4	68,8 - 83	3	h1	<b>70,7</b>	6,4	67 - 78	3
DOM23m-04						h2	<b>69,0</b>			1
DOM23m-29	m1	<b>54,2</b>	5,2	50,5 - 57,9	2					
DOM23m-32	m1	<b>39,7</b>	4,0	36,9 - 42,5	2					
DOM23m-62	m1	<b>78,6</b>			1	h1	<b>79,0</b>			1
DOM23m-71	m1	<b>44,9</b>	9,3	38,3 - 51,4	2	h1	<b>-2,0</b>			1
DOM23m-72	m1	<b>17,5</b>	24,7	0 - 34,9	2	h1	<b>1,7</b>			1
DOM23m-81	m2	<b>30,3</b>	11,5	21 - 47	4					
DOM23m-99	m2	<b>46,5</b>	28,0	26,7 - 93,5	6					
DOM23m-101	m2	<b>48,0</b>	19	22,0 - 74,1	12	h2	<b>59,8</b>	27,0	17 - 81	5
DOM23h-352	m2	<b>48,0</b>	23,9	16,8 - 78,9	16	h2	<b>46,7</b>	36,5	5,7 - 86	5
VHDUM-2	m2	<b>21,4</b>	13,2	21 - 33,9	15	h2	<b>46,0</b>	29,6	17 - 84	6
VHDUM-2	m1	<b>22,5</b>	0	22,5	2					

Tabla 6

Datos funcionales en células para clones específicos humanos más dAb placebo de VH

Método de ensayo	dAb	CI50 nM			
			Promedio	Intervalo de CI50 (+/- log DT)	n
h2	DOM23h-802	>	11.062	6.592 - 18.562	6
h2	DOM23h-803	>	11.619	5.890 - 22.922	6
h2	DOM23h-813	>	9.328	4.301 - 20.230	6
h2	DOM23h-815		7.122	3.026 - 16.764	4
h2	DOM23h-828		9.899,07	4.441 - 22.065	4
h2	DOM23h 830		6.299	5.442 - 7.291	4
h2	DOM23h-831	>	3.126	534 - 18.291	8
h2	DOM23h 840		2.915	650 - 13.081	7
h2	DOM23h 842		2.042	2.223 - 18.704	4
h2	DOM23h-843	>	9.007	3.396 -23.894	8
h2	DOM23h-850		5.350	2.358 - 12.137	6
h2	DOM23h-854	>	9.551	3.085 - 29.569	8
h2	DOM23h-855	>	4.467	1.088 - 18.339	8
h2	DOM23h 865		5.559	1.070 - 28.893	4
h2	DOM23h 866	>	1.762	195 - 15.900	6
h2	DOM23h 874	>	925	89 - 9.591	6
h2	DOM23h 883		10.123	60 - 17.344	6
h2	DOM23h 903		1.048	492 - 223	5
h2	VH placebo-2	>	25.119	25.000-250.000	12

Los clones de ratón se seleccionaron sobre la base de que mostraron más

- 5 Se seleccionaron clones de ratón sobre la base de que presentaban más del 40% de neutralización del TGF- $\beta$  en varias pruebas. La única excepción a esto fue DOM23m-72. Los clones presentaban también curvas de neutralización válidas (datos no mostrados). Los clones humanos se seleccionaron sobre la base de que los valores promedio de la CI50 fueron menores de 15  $\mu$ M.

Ejemplo 5. Maduración por afinidad propensa a error de clones sin tratamiento previo (del ejemplo 1)

- 10 Se llevó a cabo mutagenia propensa a error para mejorar la afinidad de los dAb identificados como activos con características biofísicas adecuadas (descritas anteriormente).

- 15 Construcción de la biblioteca de fagos: Se obtuvieron bibliotecas propensas a error de DOM23h-843, DOM23h-850, DOM23h-854, DOM23h-855, DOM23h-865, DOM23h-866, DOM23h-874, DOM23h-883, DOM23h-439 y DOM23h-903, usando el equipo GENEMORPH™ II Random Mutagenesis (Stratagene, nº de catálogo 200550). Los genes del dAb objetivo fueron amplificados por PCR usando ADN polimerasa de Taq y los oligonucleótidos DOM008 (5'-AGCGGATAACAATTCACACAGGA-3' (SEQ ID nº 185)) y DOM009 (5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-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'-CACGACGTTGTA AACGACGGCC-3' (SEQ ID nº 188)) y la ADN polimerasa MUTAZYME™ II, según las instrucciones del fabricante. Este producto de PCR se

amplificó además usando ADN polimerasa de Taq y los oligonucleótidos DOM172 y DOM173, para aumentar el rendimiento del producto de ADN. El producto de la PCR se digirió con las endonucleasas de restricción Sal I y Not I. El producto no digerido y los extremos digeridos se retiraron del producto digerido usando perlas de estreptavidina (Dynal Biotech, Reino Unido). Para las selecciones antihumanas propensas a error, el producto digerido se ligó 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 2xTY agar-agar enriquecido con 15 µg/ml de tetraciclina, dando tamaños de biblioteca >1x10<sup>7</sup> transformantes.

Selecciones propensas a error de dAb específicas del TGFbetaRII humano: Se llevaron a cabo tres rondas de selección con las bibliotecas 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 humano (N13241-57). Se siguieron dos métodos diferentes para las rondas dos y tres, utilizando el método 1 la forma dimérica del TGFbetaRII/Fc del antígeno, y utilizando el método 2 la forma monomérica soluble del TGFbetaRII. Método 1: La ronda dos se llevó a cabo con TGFbetaRII/Fc 1 nM biotinilado humano con el competidor TGFbetaRII/Fc 1 µM no biotinilado humano. La ronda tres se llevó a cabo con TGFbetaRII/Fc 100 pM biotinilado humano con TGFbetaRII/Fc 1 µM no biotinilado humano (N12717-4). Método 2: La ronda dos se llevó a cabo con TGFbetaRII 1 nM biotinilado humano con el competidor TGFbetaRII 1 µM no biotinilado humano. La ronda tres se llevó a cabo con TGFbetaRII 100 pM biotinilado humano con el competidor TGFbetaRII 1 µM no biotinilado humano.

Los productos de la segunda y tercera rondas de selección se subclonaron en el vector pDOM13, como se describió anteriormente. Se seleccionaron clones aislados y se expresaron en placas de 96 pocillos a 850 rpm, 37°C durante 24 horas, 90% de humedad en 0,5 ml/pocillo de medio de autoinducción rápida durante la noche enriquecido con 100 µg/ml de carbenicilina. Las placas se centrifugaron a continuación a 1.800 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se diluyeron a 1/5 o 1/2 en tampón de HBS-EP y se tamizaron sobre BIACORE™ para unirse al TGF-β RII/Fc biotinilado humano (chip de AS recubierto con 1000 Ru de hRII-Fc biotinilado según las recomendaciones del fabricante) (BIACORE™, GE HEALTHCARE™). Las muestras se introdujeron en BIACORE™ a un caudal de 50 µl/min. Los clones que se unieron con un gran número de unidades de resonancia (UR) o con una constante de velocidad de disociación mejorada en comparación con el clon original se expresaron en 50 ml de medio de autoinducción rápida durante la noche a 30°C durante 48 a 72 horas y se centrifugaron a 4.600 rpm durante 30 minutos. Los sobrenadantes se incubaron durante la noche a 4°C con perlas de STREAMLINE™-proteína A. Se rellenaron a continuación columnas de goteo con las perlas, 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 dAb unidos se eluyeron con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,0 y se neutralizaron con Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Se midió la DO de los dAb a 280 nm, y se determinaron las concentraciones de proteína utilizando coeficientes de extinción calculados a partir de las composiciones de aminoácidos de los dAb.

Análisis *in vitro* de selecciones propensas a error con constante de velocidad de disociación mejorada: Los dAb purificados se sometieron a las mismas pruebas que los de las selecciones sin tratamiento previo, a saber, Biacore, prueba del detector de células SBE-bla HEK 293T (h2), DSC y SEC-MALLS. Ejemplos de los clones mejorados por encima del original se muestran en la tabla 6A. Los valores de la CI50 son un valor promedio del número "n" de experimentos.

40 Tabla 6A

DOM23h	Constante de velocidad de asociación ka1 (1/Ms)	Constante de velocidad de disociación kd1 (1/s)	KD de Afinidad	Veces de mejora de ka	Veces de mejora de kd	Veces de mejora de KD	CI50 media (nM)*
439	2,08E+06	5,02E-02	2,42E-08				3.570 (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				1.947 (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				> 25.000 (3)
855-21	1,86E+06	3,36E-02	1,80E-08	5,6	9,4	52,3	18.580 (6)

\* El número de experimentos para el cálculo de los valores promedio de la CI50, aparece entre paréntesis

Secuencias maduras de afinidad

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-855-21 (SEQ ID nº 203)

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTGAGAATACGAGTATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
 CACGTATTGATCCTAAGGGTAGTCATACATACTACACAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 AATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGCGTGAGTTGGGTAAGTCGTATTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-855-21 (SEQ ID nº 204)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFENTSMGWVVRQAPGKGLEWVSRIDPKGSHTYYTDSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRELGKSYFDYWGGQTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-843-13 (SEQ ID nº 205)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTGATCAGGATCGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT  
 CAGCTATTGAGAGTGGTGGTTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 ATCAGAATAAGTCGGGGCGTTCCGGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-843-13 (SEQ ID nº 206)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDQDRMWWVRQAPGKGLEWVSAIESGGHRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANQNKSGRSGFDYWGGQTLVTVSS

20 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-20 (SEQ ID nº 207)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCT  
 CACGTATTGATTCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 25 AACGGCATGCGGCTGGGGTTTTGGGTACTTATTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG  
 C

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-20 (SEQ ID nº 208)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRHAAGVSGTYFDYWGGQTLVTVSS

30 Ejemplo 6. Maduración por afinidad del linaje DOM23h-271-7

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271 (SEQ ID nº 199)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANSRFDYWGGQTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271 (SEQ ID nº 200)

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 40 ACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
 TCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-7 (SEQ ID nº 201)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANSRFDYWGGQTLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-7 (SEQ ID nº 202)

45 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC

## TCGAGC

El anticuerpo de dominio DOM23h-271 (SEQ ID nº 199) se había aislado de las bibliotecas de fagos en una campaña de selección previa, y la variante DOM23h-271-7 (SEQ ID nº 201) se aisló después de la maduración de la afinidad propensa a error, como se describe en el documento WO 2011/012609. Se seleccionó DOM23h-271-7 (SEQ ID nº 201) para más maduración de la afinidad basándose en su cinética de unión, secuencia y comportamiento biofísico. Se llevó a cabo la maduración de la afinidad usando mutagenia degenerativa para rediversificar las CDR, y se identificaron las secuencias principales mejoradas usando exposición en ADN o exposición en fagos. Se construyeron dos tipos de bibliotecas para rediversificar las CDR, y éstas se denominan bibliotecas de tripletes y dopadas. Para construir las bibliotecas de tripletes, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos para abarcar cada CDR, y en cada cebador los codones para tres aminoácidos se sustituyeron por codones de NNS, de modo que se diversificaron tres posiciones. Se usaron varios oligonucleótidos para abarcar todos los aminoácidos elegidos como objetivo en de cada CDR: 2 para la CDR1, 3 para la CDR2 y 6 para la CDR3. Se utilizaron cebadores oligonucleotídicos complementarios para amplificar un fragmento de secuencia que contenía cada CDR mutada, y también un fragmento de secuencia superpuesta que abarcaba el resto de la secuencia codificante del dAb. Estos fragmentos se mezclaron y se ensamblaron por PCR de ampliación de superposición por corte y empalme para producir la secuencia codificante del dAb completa. Este producto se amplificó por PCR usando los cebadores DOM172 (SEQ ID nº 187) y DOM173 (SEQ ID nº 188), se digirió con Sall y NotI, y se ligó en pDOM4 cortado de igual manera (descrito anteriormente) para las selecciones de fagos, o pIE2A2 (descrito en el documento WO2006018650) para las selecciones de exposición en ADN. Las bibliotecas dopadas se construyeron usando un método similar, esencialmente al descrito en el documento WO2006018650. Para cubrir todas las mutaciones dentro de cada CDR se usó un solo cebador oligonucleotídico degenerado. Dentro de cada cebador, se especificaron los aminoácidos a diversificar usando codones degenerados que especifican varios aminoácidos. Se diversificaron cinco aminoácidos en la CDR1, 7 en la CDR2 y 13 en la CDR3. En los cebadores se utilizó la siguiente codificación 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 cebadores utilizados fueron:

271-7R1deg CDR1

(GCAGCCTCCGGATTACCTTTacSgaStatagSATGtgSTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGG) (SEQ ID nº 189);

271-7R2deg CDR2

30 (GGGTCTCGAGTGGGTCTCAgcSATTgaScsSatSggSaaScgSACATACTACGCAGACTCCGTG) (SEQ ID nº 190);

271-7R3deg CDR3:

(GCGGTATATTACTGTGCGAAAcSatScsSggScgSaaStgSacSgcSaaStcScgSttSGACTACTGGGGTCAGGG) (SEQ ID nº 191).

Los cebadores degenerados de la biblioteca se utilizaron de la misma manera que los cebadores de tripletes. Cada CDR diversificada se amplificó por separado y se combinó a continuación con un fragmento de secuencia original usando superposición de la ampliación por corte y empalme. Los fragmentos se subclonaron con pDOM4 y pIE2A2 usando Sall y NotI.

Exposición en ADN

Se llevaron a cabo selecciones utilizando compartimentación *in vitro* en emulsiones y exposición en ADN utilizando la proteína de unión al ADN scArc esencialmente como se describe en el documento WO2006018650. En resumen, el antígeno del TGFbRII-FC se biotiniló usando una relación molar 5:1 de biotina y el equipo EZ-LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo nº 21327). Un fragmento de ADN que contiene las secuencias de operador Arc y la casete de expresión que contiene la biblioteca del dAb diversificada, se amplificó por PCR a partir del vector pIE2A2 usando cebadores flanqueantes. El producto se purificó en un eGel (Invitrogen), y se diluyó hasta 1,7 o 0,85 nM en 1 mg/ml de BSA. Para la selección de los enlazadores mejorados, las bibliotecas dopadas y de tripletes se procesaron por separado en condiciones ligeramente diferentes. Las bibliotecas de tripletes de la CDR se combinaron para dar las bibliotecas agrupadas de la CDR 1, 2 o 3. Se emplearon diez rondas de selección para cada tipo de biblioteca. Para ambos métodos, después de 2 ciclos de selección, las CDR diversificadas se amplificaron y recombinaron por PCR con superposición de la ampliación por corte y empalme, para producir una 4ª biblioteca con mutaciones en las 3 CDR.

Para las bibliotecas dopadas, se mezclaron  $5 \times 10^8$  copias de ADN con 50 µl de la mezcla de traducción *in vitro* EXPRESSWAY™ (Invitrogen). Cada reacción contenía 10,0 µl de extracto SLYD™; 10,0 µl de 2,5x tampón de reacción; 12,5 µl de 2x tampón de alimentación; 1,0 µl de metionina (75 mM); 1,25 µl de mezcla de aminoácidos (50 mM); 15 µl de H<sub>2</sub>O; 0,5 µl de T7 polimerasa; 0,25 µl de mAb anti-HA 3F10 (Roche, nº de catálogo 1.867.423); y 1,5 µl de glutatión (100 mM) (Sigma). Esto se añadió a 800 µl de la fase hidrófoba (SPAN™-80 a 4,5%, (Fluka) + Triton X-100 al 0,5% (Sigma) en aceite mineral blanco ligero (Sigma)) en un vial de vidrio de 4 ml (CHROMACOL™ 4SV P837), y se agitó a 2.000 rpm durante 4 a 5 minutos. Los tubos se sellaron y se incubaron durante 3 horas a 30°C.

Todos los pasos posteriores se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Para extraer los complejos de ADN-proteína, se añadieron al vial 200  $\mu$ l de tampón C+ (Tris 10 mM, KCl 0,1 M, TWEEN™-20 al 0,05%, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA al 1%, pH 7,4) y 500  $\mu$ l de hexano, se mezclaron y se transfirieron a un microtubo y se centrifugaron a 13.000 g durante 1 minuto. La fase orgánica se retiró, y la fase acuosa se volvió a extraer con 800  $\mu$ l de hexano 3 a 5 veces más hasta que la interfase fue casi clara. Para las primeras 5 rondas de selecciones, el TGFbRII-FC biotinilado se unió previamente a Estreptavidina DYNAbeads™ (Invitrogen) y se añadió 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 utilizaron 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 tampón C+. Los complejos de ADN que quedaron unidos a las perlas se recuperaron entonces por PCR con cebadores flanqueantes. Las rondas de selección 6 a 10 se denominaron selecciones "solubles", cuando el TGFbRII-FC biotinilado se añadía 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 durante 30 minutos para permitir que se estableciera la unión. El TGFbRII-FC no biotinilado se añadió a continuación como competidor a 74, 750, 400, 250 y 250 nM (rondas 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente), y se incubó durante 15, 15, 30, 30 y 30 minutos (rondas 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente). En las rondas 9 y 10, un oligonucleótido bicatenario que contenía la secuencia del operador ARC se incluyó a 50 nM en el tampón C+ utilizado en las extracciones con hexano para reducir las reacciones cruzadas entre cualquier ADN no complejado y el exceso de proteína liberada de las emulsiones. Después del período de competencia, se añadieron 10  $\mu$ l de estreptavidina C1 DYNAbeads™. Después de 10 minutos, las perlas se lavaron 5 veces con tampón C+, y los complejos unidos se recuperaron por PCR con cebadores flanqueantes como se describió anteriormente. El producto de la PCR se purificó sobre un eGel y se utilizó para el siguiente ciclo de selección. Después de la décima selección, el producto recuperado se cortó con las enzimas Sall y NotI, y se clonó en el pDOM13 cortado de igual manera para expresión.

Las bibliotecas de tripletes se seleccionaron usando un método similar, salvo que se usaron  $1 \times 10^9$  copias de ADN en la primera ronda de selección, y  $5 \times 10^8$  después. Además, el tiempo de incubación para la expresión de la proteína en emulsión se redujo hasta 2 horas. El TGFbRII 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 y 2,5 nM, respectivamente. El objetivo biotinilado se incubó con los complejos extraídos durante 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 durante 15, 30, 60, 60, 75 y 90 minutos, respectivamente, antes de la adición de estreptavidina C1 DYNAbeads™. En la ronda 5, la competencia fue a temperatura ambiente, pero a partir de la ronda 6, la temperatura de 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.

Después de las selecciones, las inserciones que codifican dAb se separaron de las casetes de expresión de exposición en fagos usando Sall y NotI, y se clonaron en el vector de expresión bacteriano pDOM13. Los dAb se secuenciaron y expresaron en medio TB ONEX™, y los sobrenadantes se detectaron por BIACORE™ para identificar los clones con constantes de velocidad de disociación mejoradas, en comparación con el original. Los clones con constantes de velocidad de disociación mejoradas se expresaron y purificaron, y se evaluó la afinidad por BIACORE™ y la potencia en la prueba del detector de células. No se buscaron clones que dieran perfiles de cinética deficientes, que contienen motivos de secuencia desfavorables, o dieran muy bajos rendimientos. Se seleccionaron tres por ser de más interés. Los clones DOM23h-271-21 (SEQ ID n° 29) y DOM23h-271-22 (SEQ ID n° 30) se aislaron de selecciones de bibliotecas dopadas. El clon DOM23h-271-27 (SEQ ID n° 31) se aisló de una selección de biblioteca de tripletes. La afinidad de los clones seleccionados por el TGFbRII-FC humano, se muestra en la tabla 7.

Tabla 7

	Ka(M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	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 la tabla anterior, son sólo para clasificación, puesto que el ajuste para DOM23h-271-7 al modelo de 1:1 fue deficiente, aunque las muestras maduras de afinidad se ajustaron bien a este modelo.

#### Exposición en fagos

Bibliotecas de tripletes o dopadas en los grupos de CDR1, CDR2 y CDR3 por separado, se sometieron a rondas de selección de fagos como se describió anteriormente contra el antígeno del TGF- $\beta$  RII/Fc biotinilado 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 se clonaron en el vector de expresión pDOM10, y los sobrenadantes con constantes de velocidad de disociación mejoradas por encima del

original, se seleccionaron para su estudio posterior. Los anticuerpos de dominio se expresaron y purificaron y se probó su afinidad y bioactividad contra el antígeno del TGF- $\beta$  RII/Fc humano en el BIACORE™ T100 y en la prueba del detector de células descrito anteriormente (datos no mostrados). La afinidad de los clones seleccionados para el TGF $\beta$ RII-FC humano, se muestra en la tabla 8.

5 Tabla 8

Muestra	Ka (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	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

\* La designación "a" y "b" se refiere a sobrenadantes separados procedentes de diferentes colonias de los clones numerados.

Se determinó la secuencia de los clones seleccionados con actividad mejorada y a continuación se muestran las secuencias completas y las secuencias de la CDR.

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-21 (SEQ ID nº 29)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPGRKWTAKFRWDYWGQGLVIVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-21 (SEQ ID nº 67)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTACCGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
ACAGATGCCGGGCCGGAAGTGGACGGCCAAGTCCGCTGGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCATCGT  
20 CTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-22 (SEQ ID nº 30)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPGQKWMKSRFDYWGQGLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-22 (SEQ ID nº 68)

25 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTACCGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
ACAGATGCCGGGCCGGAAGTGGATGGCCAAGTCCGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
30 TCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-27 (SEQ ID nº 31)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGQKTYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANSRFDYWGQGLVIVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-27 (SEQ ID nº 69)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGGTCAGAAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
 5 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 AACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCATCGTC  
 TCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-101 (SEQ ID nº 32)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 10 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANGRKDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-101 (SEQ ID nº 70)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 15 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATGGTCGTAAGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
 TCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-102 (SEQ ID nº 33)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYADSVKGRFTISRDNK  
 20 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKWTANSRFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-102 (SEQ ID nº 71)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
 25 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 AACAGATTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT  
 CTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-105 (SEQ ID nº 34)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 30 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGQRWTGNSRFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-105 (SEQ ID nº 72)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 35 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGATTCCGGGGCAGCGGTGGACTGGTAATTCGCGGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
 TCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-106 (SEQ ID nº 35)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 40 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQFPGRKWTANSRSDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-106 (SEQ ID nº 73)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 45 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGTTTCCGGGGCGTAAGTGGACTGCTAATTCGCGGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
 TCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-114 (SEQ ID nº 36)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYADSVKGRFTISRDNK  
 50 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQIPGRKGTANSRFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-114 (SEQ ID nº 74)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGTAATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCGCGAC  
 5 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGATTCCGGGGCGTAAGGGAAGTCTAATTCGCGGTTTACTACTGGGGTACGGGAACCCTGGTCAACGTC  
 TCGAGC

Tabla 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)
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)	QMPGQKWMAKSRFDY (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)
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)

10 N.B. CDR2 y CDR3 son como fueron definidas por Kabat. CDR1 está definida por una combinación de los métodos de Kabat y Chothia.

Método genérico para la cinética de unión – T100

Se llevó a cabo análisis BIACORE™ usando una superficie de captura sobre un chip CM4. Se utilizó IgG anti-humano como el agente de captura y se acopló a un chip biodetector CM4 por acoplamiento de aminas primarias. La molécula de antígeno fusionada al Fc humano fue 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 tampón corriente se pasaron sobre esta superficie de captura. Una inyección de tampón sobre la superficie capturada del antígeno se usó para 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 retiró el antígeno capturado, pero no afectó significativamente a la capacidad de la superficie para capturar el antígeno en un ciclo posterior. Todas las series se llevaron a cabo a 25°C usando tampón de HBS-EP como tampón corriente. Los datos se generaron utilizando el BIACORE™ T100 y se ajustaron al modelo de unión 1:1 propio del programa informático. Cuando se observó unión inespecífica a la concentración máxima, la curva de unión a esta concentración se retiró de la serie de análisis.

25 Diversificación posterior de la CDR3

Los derivados de DOM23h-271-7 con mayor afinidad contenían metioninas en las posiciones 96 y 100B. Estas posiciones, junto con las posiciones 99, 100D, 100E y 100G, se diversificaron empleando mutagenia de NNK para

determinar si podrían hacerse las sustituciones. La biblioteca de NNK se construyó como se describió anteriormente usando el cebador PEP-26-F para introducir diversidad en las posiciones seleccionadas en el fondo 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.

5 PEP-26-F (SEQ ID nº 209)

GCGGTATATTACTGTGCGAAACAGNNSCCCGGCNNSAAGTGGNNSGCCNNSNNSCGCNNSGACTACTGGGGTC  
AGGGAACC

Se construyeron bibliotecas de exposición en 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 durante 60, 90 y 90 minutos, respectivamente, antes de la adición de estreptavidina C1 DYNAbeads™. Después de la selección, las inserciones del dAb se amplificaron por PCR usando los cebadores PelB NcoVh y PEP011, se cortaron con NcoI y EcoRI y se clonaron en el vector de expresión bacteriano pC10.

PelB NcoVh (SEQ ID nº 210) GCCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGG

15 PEP011 (SEQ ID nº 211) GAATTCGCGGCCGCCTATTAGCTCGAGACGGTGACCAGGG

Los productos clonados fueron expresados y detectados mediante Biacore. Los clones con constantes de velocidad de disociación similares o mejores que DOM23h-271-22 se secuenciaron, purificaron y evaluaron para afinidad por BIACORE™ y potencia en la prueba del detector de células. No se buscaron clones que dieran perfiles de cinética deficientes, contuvieran motivos de secuencia desfavorables, o dieran rendimientos muy bajos. Se seleccionó DOM23h-271-50 para maduración de la afinidad posterior.

Secuencia de ácido nucleico de DOM-271-50 (SEQ ID nº 212)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCTGTGCAGCC  
TCCGGATCCACCTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
25 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGCTCGCCCGGGCCGCTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCAACCG  
TCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM-271-50 (SEQ ID nº 213 y entrada del duplicado SEQ ID nº 214)

30 EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWVVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWLARGRLDYWGQGLTVVSS

Ejemplo 7. Introducción de mutaciones en las secuencias del dAb del TGFbRII (linaje de DOM23h-271) en las posiciones 61 y 64

Las mutaciones dobles D61N y K64R se han introducido previamente en varios linajes del dAb del TGFbRII, y se ha demostrado que mejoran la potencia (documento WO2011/012609). Estas mutaciones fueron introducidas en los linajes de DOM23h-271 del dAb del TGFbRII para ver si podría conseguirse una mejora similar en la potencia. Se exploraron mutaciones alternativas en esta posición para determinar si podrían conseguirse más mejoras en la potencia.

Se introdujeron mutaciones en el eje central de DOM23h-271 (SEQ ID nº 199) mediante ampliación por superposición usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ho, *et al.*, *Gene* 1989 77(1)); se utilizaron cebadores oligonucleotídicos complementarios para generar dos fragmentos de ADN que tenían extremos superpuestos o complementarios. Estos fragmentos se combinaron en una PCR de montaje posterior en la que los extremos superpuestos se hibridan, permitiendo que el superposición en 3' de cada cadena sirva como cebador para la ampliación 3' de la cadena complementaria, y el producto de fusión resultante sea amplificado más mediante PCR. Se introdujeron alteraciones específicas en la secuencia de nucleótidos incorporando cambios de nucleótidos en los cebadores oligonucleotídicos superpuestos. Los fragmentos del gen del dAb objetivo se amplificaron mediante dos PCR por separado utilizando la polimerasa SUPERTAQ™ (HT Biotechnology). Se seleccionó DOM23h-271, ya que tiene una baja afinidad por TGFbRII, de modo que las mejoras en la afinidad fueran claramente mensurables usando BIACORE™. Las mutaciones en las posiciones 61 y 64 se codificaron usando un oligonucleótido degenerado que muta ambas posiciones en combinación, con la intención de utilizar 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 biblioteca usando un codón restringido, NNG, en la posición 61. Este codón codifica 13 aminoácidos, pero no incluye los aminoácidos F, Y, C, H, I, N o D. La Cys libre no estaba favorecida dentro de un dAb, y la asparagina tampoco se deseaba en esta posición, de modo que sólo se excluyeron 5 combinaciones de aminoácido deseables. En la posición 64, se usó un codón NNK para proporcionar la gama completa de aminoácidos 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 deg-F mutado (restos mutados subrayados: 5'-GGTAATCGTACATACTACGCANNGTCCGTGNNKGGCCGGTTCACCATCTCCCGC-3') (SEQ ID nº 194) con AS1309 (flanquea el extremo 3' del gen del dAb: 5'-TGTGTGTGTGTGGCGGCCGCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGACCCCA-3') (SEQ ID nº 195). Los dos fragmentos de PCR se recombinaron en una PCR de montaje usando la ADN polimerasa SUPERTAQ™ sin la adición de cebadores. El producto de fusión se amplificó a continuación mediante la adición de los cebadores flanqueantes PE008 y AS1309 a la reacción de PCR. El dAb mutado se digirió con las endonucleasas de restricción Sal I y Not I, se ligó en el vector de expresión pDOM13 cortado de igual manera y se transformó en células HB2151 de *E. coli*. La mutación en D61N, K64R se introdujo también en DOM23h-271 de la misma manera, pero sustituyendo el cebador 271-6164 NR-F (5'-GGTAATCGTACATACTACGCAAACCTCCGTGCGCGGCCGGTTCACCATCTCCCGC-3') (SEQ ID nº 196) por 271-6164 deg-F. Los dAb mutados se identificaron por secuenciación. Se identificaron 129 clones con combinaciones novedosas de mutaciones en la posición 61 y 64, aunque 11 llevaban mutaciones adicionales procedentes de errores de la PCR. Estos se muestran en la tabla 11. Los clones con afinidad aumentada están subrayados. Los clones con mutaciones adicionales están indicados con asteriscos.

Para determinar el efecto de las mutaciones, los clones seleccionados se expresaron en TB ONEX™ en placas de 96 pocillos durante 72 horas a 30°C o 24 horas a 37°C. Los sobrenadantes se clarificaron por centrifugación y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm antes de la evaluación de la constante de velocidad de disociación por BIACORE™.

Se llevó a cabo el análisis BIACORE™ A100 utilizando una superficie de captura sobre un chip CM5. Se usó IgG anti-humano como agente de captura, y se acopló a un chip biodetector CM5 mediante acoplamiento de aminas primarias. La molécula de antígeno fusionada con el Fc humano se capturó sobre esta superficie inmovilizada hasta un nivel de 200 a 300 unidades de resonancia, y los sobrenadantes o los anticuerpos de dominio purificados se pasaron sobre esta superficie capturada. Una inyección de medio o tampón sobre la superficie capturada del antígeno se usó para 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 de anticuerpo de dominio usando una solución de cloruro de magnesio 3 M; la regeneración retiró el antígeno capturado, pero no afectó significativamente la capacidad de la superficie para capturar el antígeno en un ciclo posterior. Todas las series se llevaron a cabo a 25°C usando tampón de HBS-EP como tampón de la serie. Los datos se generaron usando el BIACORE™ T100 y se analizaron usando su programa informático propio. Las cinéticas de las muestras purificadas se ajustaron 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 original.

De los clones probados, se identificaron 46 con constante de velocidad de disociación mejorada en comparación con el dAb de DOM23h-271 original, como se indica en la tabla 11. Se encontró que las mutaciones D61R y D61K aumentan la unión independientemente de las mutaciones en la posición 64. Varias combinaciones parecieron ser mejores 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 BIACORE™ A100 completo, para determinar su afinidad (tabla 10). La estabilidad térmica de los mutantes se determinó también mediante la generación de curvas de fusión en presencia de SYPRO™ Orange (Invitrogen). En resumen, los dAb purificados se diluyeron hasta 50 y 100 µg/ml en una dilución 1:500 de SYPRO™ Orange en PBS, y se sometieron a una curva de fusión de 30 a 90°C en una máquina de PCR Mini OPTICON™ (BioRad). La Tm de la transición positiva mayor se determinó a cada concentración y se usó para calcular un valor de Tm estimado en 1 mg/ml como una indicación de la temperatura de fusión por comparación (tabla 10).

Se seleccionaron las mutaciones D61R, K64D y D61R, K64F, ya que tenían una buena mejora en afinidad por un impacto reducido en la Tm. Estas mutaciones se transfirieron a un derivado de DOM23h-271 madurado por afinidad, DOM23h-271-22 (SEQ ID nº 30), para obtener el DOM23h-271-39 (SEQ ID nº 37) y DOM23h-271-40 (SEQ ID nº 38) de los dAb. Se descubrió que estas mutaciones dan una mejora en afinidad mediante BIACORE™ como por ejemplo la reactividad cruzada con el TGFβRIIFc murino, y la potencia aumentada mediante la prueba del detector de células. Sin embargo, se descubrió además que las mutaciones reducen la Tm medida por DSC, y aumentan la agregación de los dAb en PBS, medida por SEC MALLS. Estas pruebas se llevaron a cabo como se describió anteriormente, salvo que el tampón 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 la tabla 12 (se dan los valores promedio para la prueba del detector de células humanas y la prueba de luciferasa 3T3 en ratón).

A continuación se dan las secuencias de los dAb citados en este ejemplo:

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-39 (SEQ ID nº 37)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYARSVDGRFTISRDNK

## ES 2 627 299 T3

NTRYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPGQKWMAKSRFDYWGGTGLTVVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-39 (SEQ ID nº 75)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 5 CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCACGCTCCGTGGACGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
 CAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 AACAGATGCCCGGCCAGAAGTGGATGGCCAAGTCCCGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT  
 CTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-40 (SEQ ID nº 38)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGNRTYYARSVFGRFTISRDNK  
 NTRYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQMPGQKWMAKSRFDYWGGTGLTVVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-40 (SEQ ID nº 76)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 15 CAGCGATTGAGCCGATTGGTAATCGTACATACTACGCACGCTCCGTGTTCCGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGATGCCCGGCCAGAAGTGGATGGCCAAGTCCCGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
 TCGAGC

Tabla 10

Descripción	Mutación	Tm estimada 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

20

N.B. La mutación corresponde a "XY", en donde X es la posición 61  
 e Y es la posición 64.

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

Los clones con constante de velocidad de disociación mejorada están subrayados. Los clones con mutaciones adicionales se indican mediante asteriscos.

Tabla 12

	Mutación	Detector de células humanas	Prueba de luciferasa en células 3T3 de ratón	TGFbRII humano	TGFbRII de <i>cynomolgus</i>	TGRbRII de ratón	T <sub>m</sub> (DSC)	Agregación (SEC-MALLS)
		CI50 (nM)	CI50 (nM)	KD (pM)	KD (pM)	KD (pM)		
DOM23h-271-22	-	39,01	>17.780	202,00	225,00	-	60	91,8% de monómero 8,2% de dímero
DOM23h-271-39	RD	1,17	11.120	14,90	24,00	1.780,00	57,5	51,6% eq. de M/D 38,5% eq. de D/T + agregados
DOM23h-271-40	RF	0,53	1.200	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

Se aislaron los anticuerpos de dominio DOM23h-855-21 (SEQ ID nº 204) y DOM23h-843-13 (SEQ ID nº 206) de la maduración de la afinidad propensa a error llevada a cabo en los clones sin tratamiento previo DOM23h-855 (SEQ ID nº 13) y DOM23h-843 (SEQ ID nº 10), respectivamente, como se detalla en el ejemplo 5. El anticuerpo de dominio DOM23h-439 se aisló de bibliotecas 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 de la afinidad propensa a error como se detalla en el ejemplo 5. Se generó el anticuerpo de dominio DOM23h-271-50 (SEQ ID nº 214) por re-diversificación de la CDR3 de la variante DOM23h-271-22 (SEQ ID nº 30) madurada de afinidad dirigida por la CDR 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 de la afinidad basándose en su cinética de unión, potencia en la prueba del detector de células HEK 293T SBE-bla, secuencia y comportamiento biofísico. Se llevó a cabo la maduración de la afinidad usando mutagenia degenerada para rediversificar las CDR, y las secuencias principales mejoradas se identificaron usando exposición en fagos. Se introdujo diversidad en las CDR mediante la construcción de bibliotecas dopadas o de NNK.

DOM23h-271-50 maduró la afinidad usando bibliotecas de NNK (mutagenia de saturación), se diseñaron oligonucleótidos cebadores para cubrir cada CDR, y en cada cebador los codones para 5 aminoácidos fueron reemplazados por 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 en cada CDR; 1 para la CDR1, 2 para la CDR2 y 3 para la CDR3. Se consiguió la maduración de la afinidad dirigida por la CDR utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); se utilizaron cebadores oligonucleotídicos complementarios para amplificar un fragmento de secuencia que contenía cada CDR mutada, y también un fragmento de secuencia superpuesto que cubre el resto de la secuencia que codifica el dAb. Estos fragmentos se mezclaron y se ensamblaron mediante PCR con superposición de la ampliación por corte y empalme para producir la secuencia codificante del dAb completa. Este producto se amplificó por PCR usando los cebadores PelB NcoVh (SEQ ID nº 210) y PEP044 (5'-GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGGCCGCATAATAAGAATTCA-3' SEQ ID nº 215), se digirió con NcoI y NotI y se ligó 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 se ha modificado para reemplazar la secuencia principal GAS por el péptido señal pelB (peptato liasa B).

Los anticuerpos de dominio DOM23h-855-21, DOM23h-843-13 y DOM23h-439-20 maduraron la afinidad usando bibliotecas dopadas. Las bibliotecas dopadas se construyeron esencialmente como se describió anteriormente y en el documento WO2006018650. Un solo cebador oligonucleotídico degenerado se utilizó para cubrir todas las mutaciones en cada CDR. En cada cebador, los aminoácidos a ser diversificados se especificaron empleando codones degenerados que codifican varios aminoácidos. Se empleó 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 biblioteca dopada de DOM23h-439-20 se diversificaron cinco aminoácidos en la CDR1, 6 en la CDR2 y 11 en la CDR3 para incluir la fenilalanina en la posición 100. Para la biblioteca dopada de DOM23h-855-21 se diversificaron cinco aminoácidos en la CDR1, 7 en la CDR2 y 8 en la CDR3. Para la biblioteca dopada de DOM23h-843-13 se diversificaron cinco aminoácidos en la CDR1, 6 en la CDR2 y 8 en la CDR3, la posición 94, antes de la CDR3 se diversificó también introduciendo el codón VRK. Para cada uno de los dAb, se construyeron 4 bibliotecas dopadas, una para diversificar la CDR1, una para diversificar la CDR2, una para diversificar la CDR3, y una cuarta cuando todas las CDR fueron diversificadas. Los cebadores degenerados de la biblioteca se usaron de la misma manera que los cebadores de tripletes. Cada CDR diversificada se amplificó por separado y a continuación se combinó con un fragmento de secuencia original usando superposición de ampliación por corte y empalme, y el producto completo se amplificó usando los cebadores PelB NcoVh (SEQ ID nº 210) y DOM173 (SEQ ID nº 188). Los fragmentos se subclonaron con el vector híbrido pDOM4-gene3-pelB utilizando NcoI y NotI.

50 Secuencias del cebador degenerado:

23h-439-20 CDRH1 (SEQ ID nº 216)

5'-GCAGCCTCCGGATTCACCTTTggSacSgagcagATGtgTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG-3'

23h-439-20 CDRH2 (SEQ ID nº 217)

5'-AAGGGTCTAGAGTTTGTCTCAcgSATTgattcScsSGGTggScgSACATACTACGCAGACTCCGTG-3'

55 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 5'-ACCGCGGTATATTACTGTGCGVRKcagaataagtcSggScgStcSggSTTTGACTACTGGGGTCAGGGA-3'

23h-855-21 CDRH1 (SEQ ID nº 222)

5'-GCAGCCTCCGGATTCACCTTTgagaatacStcSATGggSTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG-3'

23h-855-21 CDRH2 (SEQ ID nº 223)

10 5'-AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAcgSATTgatccSaagGGTtcScatACATACTACacSACTCCGTG-AAGGGCCGGTTCACC-3'

23h-855-21 CDRH3 (SEQ ID nº 224)

5'-GCGGTATATTACTGTGCGAAAcagcgSgagctSggSaagtcStaYTTTGACTACTGGGGTCAGGGA-3'

H1-271-43 R (SEQ ID nº 225)

5'-GCAGCCTCCGGATTCACCTTTNNKNNKNNKNNKATGNNKTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTC-3'

15 H2p1-271-43F (SEQ ID nº 226)

5'-CCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCANNKATTNNKNNKNNKGGTNNKCGTACATACT-ACGCAGACTCCG-3'

H2p2-271-43 F (SEQ ID nº 227)

20 5'-CCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCTCAGCGATTGAGNNKNNKNNKNNKNNKACATAC-TACGCAGACTCCG-3'

H3p1-271-43 F (SEQ ID nº 228)

5'-ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAANNKNNKNNKNNKNNKAAGTGGATGGCCGTGGGCCGCTTGGACTAC-TGGGGTCAGGG-3'

H3p2-271-43 F (SEQ ID nº 229)

25 5'-ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGAAGCCCNKNNKNNKNNKNNKGCCGTGGGCCGCTTGGACTACTG-GGGTCAGGG-3'

H3p3-271-43 F (SEQ ID nº 230)

5'-ACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACAGAAGCCCGGCCAGAAGTGGNNKNNKNNKNNKNNKTTGGACTACTG-GGGTCAGGG-3'

30 Exposición en fagos:

Las bibliotecas de NNK o dopadas en los grupos de la CDR1, la CDR2 y la CDR3 por separado y de la CDR1, 2 y 3 combinados, se sometieron al menos a 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 humano (rondas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente) como se describió en el ejemplo 1, con la siguiente desviación para la etapa de bloqueo; el fragmento Fc de IgG humana

35 que se añadió previamente en el ejemplo 1 se omitió y la etapa de bloqueo se realizó durante 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 durante 30 minutos (rondas 4 y 6) después de la etapa de incubación con el antígeno marcado.

40 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 humano biotinilado y competencia a 100 nM durante 120 minutos o el antígeno del TGF-β RII 20 pM monomérico humano biotinilado con competencia a 100 nM durante 30 minutos. El fago se amplificó entre las rondas de selección por centrifugación de un cultivo durante la noche de células TG1 infectadas con el fago durante 30 minutos a 4.000 g. Se añadieron 40 ml del sobrenadante que contenía al fago amplificado a 10 ml de PEG/NaCl (PEG 8000 al 20% en v/p + NaCl 2,5 M), y se

45 incubaron sobre hielo durante 60 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 40 minutos a 4.000 g para sedimentar el fago precipitado. El sobrenadante se desechó, y el sedimento de fagos se volvió a poner en suspensión en 1 ml de glicerol al 15%/PBS en v/v. La muestra de fagos se transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml y se

centrifugó durante 10 minutos para retirar cualquier residuo celular bacteriano restante. Los genes del Vh del anticuerpo de dominio diversificados de las selecciones de fagos se amplificaron por PCR usando los cebadores PEP011VHStopNotIR (5'-CCCTGGTCACCGTCTCGAGCTAATAGGCGGCCGCGAATTC-3' (SEQ ID nº 231) y Nco1 VH F (5'-TATCGTCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG-3' (SEQ ID nº 232), se digirieron con las endonucleasas de restricción NcoI y NotI y se ligaron en el vector pC10 también digerido con NcoI y NotI. pC10 es un vector plásmido basado en el vector pUC119, con expresión bajo el control de un activador LacZ mejorado diseñado para la expresión soluble de los dAb. La expresión de los dAb en el sobrenadante está activada por la fusión del gen de los dAb con el péptido señal pEIB en el extremo terminal N. Los productos de ligadura se transformaron en células HB2151 de *E. coli* químicamente competentes y se sembraron en placas de agar-agar nutritivo enriquecido con 100 µg/ml de carbenicilina. Cada uno de los clones se seleccionaron y expresaron en medio de autoinducción rápida durante la noche (sistema de expresión de proteínas de alto nivel, Novagen), se enriquecieron con 100 µg/ml de carbenicilina en placas de 96 pocillos y se cultivaron con agitación a 250 rpm durante 66 horas a 30°C o 24 horas a 37°C. Las placas de expresión se centrifugaron a continuación a 3.500 g durante 15 minutos y los sobrenadantes se filtraron usando placas de filtración de 0,45 µ (Millipore). Los sobrenadantes que contenían los anticuerpos de dominio se detectaron en el BIACORE™ B4000 contra el TGF-β RII humano y el TGF-β RII/Fc humano, para determinar la constante de velocidad de disociación (Kd) (datos no mostrados). Los antígenos biotinilados se capturaron sobre un chip de AS según las instrucciones del fabricante, se llevó a cabo el análisis a 25°C usando tampón de HBS-EP. Las muestras se introdujeron en el BIACORE™ a un caudal de 30 µl/min. Se consiguió la regeneración del chip usando glicina a bajo pH. Los datos (no mostrados) se analizaron para la constante de velocidad de disociación ajustando la fase de disociación al modelo de disociación 1:1 propio del programa informático, se analizó también la unión a proteína A en los sobrenadantes para estimar los niveles de expresión. Los anticuerpos de dominio con constantes de velocidad de disociación mejoradas por encima del original se seleccionaron para estudio posterior. Los clones mejorados se expresaron en medio de autoinducción rápida durante la noche (ONEX™, Novagen) enriquecido con 100 µg/ml de carbenicilina y antiespumante (Sigma) a 30°C durante 48 a 72 horas con agitación a 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron (4.200 rpm durante 40 minutos) y los sobrenadantes se incubaron con perlas de STREAMLINE™-proteína A (Amersham Biosciences, GE HEALTHCARE™, Reino Unido. Capacidad de unión: 5 mg de dAb por ml de perlas), a 4°C o a temperatura ambiente durante por lo menos una hora. La columna de cromatografía se rellenó con las perlas y se lavó con PBS, seguido de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (Sigma, Reino Unido). Los dAb unidos se eluyeron con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,0 y se neutralizaron con Tris-HCl 1 M, pH 8,0. La DO a 280 nm de los dAb se midió y se determinaron las concentraciones de proteína utilizando los coeficientes de extinción calculados a partir de las composiciones de aminoácidos de los dAb. Los anticuerpos de dominio madurado de afinidad se probaron en el BIACORE™ T200 (los datos para dos dAb preferidos se muestran en el ejemplo 9) y en la prueba del sensor de células SBE-bla HEK 293T (los datos para dos dAb preferidos se muestran en el ejemplo 11) para determinar su afinidad y potencia. Se determinaron propiedades biofísicas incluidas la estabilidad térmica y el estado en solución usando calorimetría de barrido diferencial (DSC) y cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz de láser de ángulos múltiples (SEC-MALLS) (los datos para dos dAb preferidos se muestran en el ejemplo 10).

Se muestran a continuación las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de los dAb del TGFRII anti-humano DOM23h-439-20 y DOM23h-271-50 madurados por afinidad.

40 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-25 (SEQ ID nº 233)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCT  
CACGTATTGATTCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
45 AACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG  
C

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-25 (SEQ ID nº 234)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSFTFYDYWGQGLVTVSS

50 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-123 (SEQ ID nº 235)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATCCACCTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
55 AACAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCG  
TCTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-123 (SEQ ID nº 236)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRYYADSVKGRFTISRDNK

NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-35 (SEQ ID nº 237)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATTACCTTTGGGACCGATCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCT  
 5 CACGCATTGATTCCCCGGTGGGCGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 AACGGCAGCCGGCGGGGTGTCTGGGGAAGTACGTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA  
 GC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-35 (SEQ ID nº 238)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTDQMWWVRQAPGKGLFVSRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRQPAGVSGKYVDYWGQGLVTVSS

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-129 (SEQ ID nº 239)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 15 CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 AACAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGCCGCTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT  
 CTCGAGC

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-129 (SEQ ID nº 240)

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRYYADSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPNQRVARGRLDYWGQGLVTVSS

Las CDR definidas por Kabat de estas secuencias principales de afinidad del dAb del TGFRII anti-humano se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Secuencias de la CDR de los dAb del TGFβRII anti-humano madurados por afinidad

	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)	QAPGEKWARRWDLDY (SEQ ID nº 243)
DOM23h-271-129	GSTFTEYRMW (SEQ ID nº 244)	AIEPIGHRYYADSVKG (SEQ ID nº 245)	QAPNQRVARGRLDY (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)

25

Modificación posterior de la secuencia de nucleótidos de DOM23h-439-25 y DOM23h-271-123

Las mutaciones D61N y K64R descritas en el ejemplo 7 se introdujeron en los dAb madurados por afinidad DOM23h-439-25, DOM23h-271-123 y DOM23h-271-129 en combinación o por separado. La introducción de una mutación V48I en los dAb de DOM23h-439-25 y DOM23h-271-123 se probó también para determinar si podrían conferir mejoras en potencia. Se observó mutación espontánea en la posición 48 de Kabat en numerosos dAb mejorados del linaje DOM23h-439 tanto después de la prueba de maduración como de la maduración de la afinidad dirigida por la CDR. Una alanina en el extremo terminal C de la región Vh, inmediatamente después del resto 113 de Kabat se añadió también a DOM23h-439-25, DOM23h-271-123 y DOM23h-271-129 y todas las variantes de estos dAb con las mutaciones mencionadas anteriormente. Las mutaciones se introdujeron en los ejes centrales de  
 30 DOM23h-439-25 (SEQ ID nº 234), DOM23h-271-123 (SEQ ID nº 236) y DOM23h-271-129 (SEQ ID nº 240) mediante ampliación por superposición usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) esencialmente como se describió en el ejemplo 7. Se introdujeron mutaciones específicas en la secuencia de nucleótidos incorporando cambios de nucleótidos en los cebadores oligonucleotídicos superpuestos, la inserción de la alanina en el extremo de la región Vh se logró usando un oligonucleótido en 3' diseñado para incorporar el resto de alanina después de la  
 35 posición 113 de Kabat.  
 40

Se usaron los siguientes oligonucleótidos para introducir las mutaciones (los restos mutados están subrayados):

439 48I SDM F (SEQ ID nº 253)

5'-GGGTCTAGAGTTTATTTACGTATTGATTGCGCC-3'

439 61N SDM F (SEQ ID nº 254)

5'-GGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGG-3'

5 439 64R SDM F (SEQ ID nº 255)

5'-CGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

439 61N 64R SDM F (SEQ ID nº 256)

5'-GGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

271 61N SDM F (SEQ ID nº 257)

10 5'-GGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGG-3'

271 64R SDM F (SEQ ID nº 258)

5'-CGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

271 61N 64R SDM F (SEQ ID nº 259)

5'-GGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGGCCGGTTCACC-3'

15 567 +A rev (flanquea el extremo 3' del gen de la Vh del dAb) (SEQ ID nº 260)

5'-CCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGTAATAAGCGGCCGAGATTA-3'

21-23 Fwd (flanquea el extremo 5' del gen de la Vh del dAb) (SEQ ID nº 261)

5'-ATAAGGCCATGGCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG-3'

20 Para determinar el efecto de las mutaciones los dAb se expresaron en TB ONEX™ enriquecido con 100 µg/ml de carbenicilina y antiespumante (Sigma) a 30°C durante 72 horas con agitación a 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron (4.200 rpm durante 40 minutos), y los dAb 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 dAb preferidos se muestran en el ejemplo 9) y en la prueba del detector de células HEK 293T SBE-25 bla (los datos para los dAb preferidos se muestran en el ejemplo 11).

Se dan a continuación las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de los dAb del TGFRII anti-humano DOM23h-439-25 (SEQ ID nº 234) y DOM23h-271-123 (SEQ ID nº 236) modificados para incluir la alanina del terminal C y las mutaciones D61N, K64R o V48I:

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-40 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C) (SEQ ID nº 262)

30 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCT  
CACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAG  
35 CGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-40 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C) (SEQ ID nº 263)

EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWVVRQAPGKLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSQGFYDYWGQGLVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-41 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C + 48I) (SEQ ID nº 264)

40 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTATTT  
CACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAG  
45 CGCG

ES 2 627 299 T3

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-41 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C + 48I) (SEQ ID nº 265)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFISRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSFTFYDYWGQGLTVVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-42 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C + 61N) (SEQ ID nº 266)

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCT  
CACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG  
10 CGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-42 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C + 61N) (SEQ ID nº 267)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSFTFYDYWGQGLTVVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-43 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C + 64R) (SEQ ID nº 268)

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCT  
CACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAGCTCCGTGCGTGCCGCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG  
20 CGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-43 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C + 64R) (SEQ ID nº 269)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVRGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSFTFYDYWGQGLTVVSSA

25 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-44 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C + 61N64R) (SEQ ID nº 270)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATTCACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTGTCT  
CACGTATTGATTGCGCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGCCGCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCCGCGGTATATTACTGTGCGA  
30 AACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG  
CGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-44 (DOM23h-439-25 + alanina del terminal C + 61N64R) (SEQ ID nº 271)

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYANSVRGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSFTFYDYWGQGLTVVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-130 (DOM23h-271-123 + alanina del terminal C) (SEQ ID nº 272)

40 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCG  
TCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-130 (DOM23h-271-123 + alanina del terminal C) (SEQ ID nº 273)

45 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYRMMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRTYYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-131 (DOM23h-271-123 + alanina del terminal C + 61N) (SEQ ID nº 274)

50 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC

AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
ACAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT  
CTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-131 (DOM23h-271-123 + alanina del terminal C + 61N) (SEQ ID nº 275)

- 5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWVVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYANSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-132 (DOM23h-271-123 + alanina del terminal C + 64R) (SEQ ID nº 276)

- 10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGCGTGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
AACAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCG  
TCTCGAGCGCG

- 15 Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-132 (DOM23h-271-123 + alanina del terminal C + 64R) (SEQ ID nº 277)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWVVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYADSVRGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVTVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-133 (DOM23h-271-123+ alanina del terminal C + 61N64R) (SEQ ID nº 278)

- 20 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
ACAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT  
25 CTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-133 (DOM23h-271-123+ alanina del terminal C + 61N64R) (SEQ ID nº 279)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWVVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYANSVGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVTVSSA

- 30 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-134 (DOM23h-271-123+ alanina del terminal C + 48I) (SEQ ID nº 280)

- GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
35 AACAGGCGCCCGGCGAGAAGTGGGCGAGGCGGTGGGATTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCG  
TCTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-134 (DOM23h-271-123+ alanina del terminal C + 48I) (SEQ ID nº 281)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWVVRQAPGKLEWVSAIEPIGHRITYADSVKGRFTISRDNK  
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGLTVTVSSA

- 40 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-135 (DOM23h-271-129 + alanina del terminal C) (SEQ ID nº 282)

- GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
45 AACAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGGCCGCTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT  
CTCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-135 (DOM23h-271-129 + alanina del terminal C) (SEQ ID nº 283)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWVVRQAPGKLEWVSAIEPIGHRITYADSVKGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPNQRVARGRLDYWGQGLTVTVSSA

- 50 Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-136 (DOM23h-271-129 + alanina del terminal C + 61N) (SEQ ID nº 284)

284)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 5 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGCCGCTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
 TCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-136 (DOM23h-271-129 + alanina del terminal C + 61N) (SEQ ID nº 285)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWVVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYANSVKGRFTISRDNK  
 10 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPNQRYVARGRLDYWGQGLTVVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-271-137 (DOM23h-271-129 + alanina del terminal C + 61N64R) (SEQ ID nº 286)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 TCCGGATCCACCTTTACGGAGTATAGGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTCT  
 15 CAGCGATTGAGCCGATTGGTCATAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGCCGCGGTTCACCATCTCCCGCGAC  
 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGTGCGAA  
 ACAGGCGCCCAATCAGAGGTATGTTGCCCGGGCCGCTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
 TCGAGCGCG

Secuencia de aminoácidos de DOM23h-271-137 (DOM23h-271-129 + alanina del terminal C + 61N64R) (SEQ ID nº 287)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWVVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHRITYANSVVRGRFTISRDNK  
 20 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPNQRYVARGRLDYWGQGLTVVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-47 (DOM23h-439-42 + 48I) (SEQ ID nº 288)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 25 TCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTATTT  
 CACGTATTGATTCGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGA  
 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 AACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG  
 CGCG

30 Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-47 (DOM23h-439-42 + 48I) (SEQ ID nº 289)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVVRQAPGKLEFISRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVVSSA

Secuencia de ácido nucleico de DOM23h-439-48 (DOM23h-439-44 + 48I) (SEQ ID nº 290)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC  
 35 TCCGGATTACCTTTGGGACGGAGCAGATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTTTATTT  
 CACGTATTGATTCGCCTGGTGGGAGGACATACTACGCAAACCTCCGTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGA  
 AACGGCGACCCACGGGGGTGTCCGGGACGTTTTATGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG  
 CGCG

40 Secuencia de aminoácidos de DOM23h-439-48 (DOM23h-439-44 + 48I) (SEQ ID nº 291)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVVRQAPGKLEFISRIDSPGGRTYYANSVVRGRFTISRDNK  
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVVSSA

Ejemplo 9. Análisis cinético por Biacore de anticuerpos de dominio madurados por afinidad

Se inmovilizó la IgG anti-humana en un chip CM4 de Biacore por acoplamiento de aminas primarias, según las  
 45 instrucciones del fabricante. Se capturaron en esta superficie TGF-β RII/Fc humano, TGF-β RII/Fc de *cynomolgus* o  
 fragmento Fc humano. Los anticuerpos de dominio se pasaron sobre los dos receptores capturados a 3  
 concentraciones de 100, 10 y 1 nM (dAb de DOM23h-439) o 100, 25 y 6,25 nM (dAb de DOM23h-271). Sólo la  
 concentración de 100 nM de cada dAb se pasó sobre el fragmento Fc humano para confirmar la especificidad de  
 unión con el dominio del TGF-β RII extracelular. Una inyección de tampón sobre la superficie del antígeno capturado  
 50 se usó como doble referencia. La superficie capturada se regeneró, después de cada inyección del anticuerpo de  
 dominio, empleando solución de cloruro de magnesio 3 M; la regeneración eliminó el antígeno capturado, pero no  
 afectó significativamente la capacidad de la superficie para capturar el antígeno en un ciclo posterior. Todas las

series se llevaron a cabo a 25°C usando tampón de HBS-EP como tampón corriente. Los datos se generaron usando el BIACORE™ T200 y se ajustaron al modelo de unión 1:1 propio del programa informático. La tabla 14 muestra la cinética de unión de los dAb probados. Los dAb del DOM23h-271 y los linajes de DOM23h-439 se pasaron en experimentos separados.

5 Tabla 14

Muestra	TGFBRII humano			TGFBRII de <i>cynomolgus</i>		
	Ka (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	KD (M)	Ka (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	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

## Ejemplo 10. Evaluación biofísica de los dAb madurados por afinidad

- Se determinó la estabilidad térmica de los dAb usando calorimetría de barrido diferencial (DSC). Se dializaron los dAb durante la noche en tampón de PBS y ajustados a una concentración final de 1 mg/ml. Se usó tampón de diálisis como referencia para todas las muestras. La DSC se llevó a cabo usando un microcalorímetro de celda capilar VP-DSC (GE healthcare/Microcal), a un ritmo de calentamiento de 180°C/hora. Un intervalo típico de exploración fue de 20 a 90°C tanto para el tampón de referencia como para la muestra de proteína. Después de cada par de tampón de referencia y muestra, la celda capilar se limpió con una solución de Decon al 5% (Fisher-Scientific) en agua seguido de PBS. Los rastros de los datos resultantes se analizaron usando el programa informático Origin 7.0. El rastro de DSC obtenido a partir del tampón de referencia se sustrajo del rastro de la muestra. La concentración molar exacta de la muestra se introdujo en la rutina del análisis de datos para dar valores para la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), entalpía (ΔH) y entalpía de Van't Hoff (ΔH<sub>v</sub>). Los datos se ajustaron a un modelo que no era de 2 estados. Se obtuvieron valores de mejor ajuste y de dependencia con 1 o 2 casos de transición. Se determinó también la temperatura de desplegamiento integrando a partir de cero cada termograma de la muestra. Este valor se determinó entonces como la temperatura a la que se desplegó el 4% de la muestra.

Tabla 14A

Denominación de la proteína	Tm aparente (°C)	Temperatura de inicio (°C)
DOM23h-439-21	<b>60,66</b>	<b>52,5</b>
DOM23h-439-25	<b>56,34</b>	<b>49</b>
DOM23h-439-30	<b>57,17</b>	<b>50</b>
DOM23h-439-32	<b>55,01</b>	<b>49</b>
DOM23h-439-33	<b>58,93</b>	<b>51</b>
DOM23h-439-34	<b>56,78</b>	<b>50</b>
DOM23h-855-42	<b>61,90</b>	<b>55</b>
DOM23h-855-43	<b>66,81</b>	<b>58,6</b>
DOM23h-855-44	<b>63,38</b>	<b>56</b>
DOM23h-271-123	<b>54,82</b>	<b>50,6</b>
DOM23h-271-124	<b>58,16</b>	<b>52</b>
DOM23h-271-125	<b>58,26</b>	<b>55</b>

Análisis del estado de la solución por cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz de láser con múltiples ángulos (SEC-MALLS)

- 5 Para determinar si los dAb son monoméricos o forman oligómeros de orden superior en solución, se analizaron por SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz de láser con múltiples ángulos). Un sistema de HPLC serie 1100 de Agilent con un cargador automático de muestras y un detector de UV (controlado por el programa informático Empower) se conectó al detector Wyatt Mini Dawn Treos (detector de dispersión de luz láser (LS)) y Wyatt Optilab rEX DRI (detector de índice de refracción (IR) diferencial). Los detectores se conectaron en el siguiente orden -UV-LS-RI. Los instrumentos IR y LS operan a una longitud de onda de 658 nm; la señal UV se controla a 280 nm y 220 nm. Los anticuerpos de dominio (50 microlitros de inyección a una concentración de 1 mg/ml en PBS) se separaron según sus propiedades hidrodinámicas por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna TSK2000. La fase móvil fue NaCl 0,2 M, NaPO<sub>4</sub> 0,1 M y n-propanol al 15%. La intensidad de la luz dispersa mientras la proteína pasaba a través del detector, se midió en función del ángulo. Esta medición tomada
- 10 junto con la concentración de proteína determinada usando el detector de RI, permitió el cálculo de la masa molar empleando ecuaciones apropiadas (parte integral del programa informático de análisis Astra v.5.3.4.14). El estado de la solución como porcentaje de monómero, se muestra en la tabla 15.

Tabla 15

	Porcentaje de monómero
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%

Ejemplo 11. Inhibición del TGFβ-RII por los dAb madurados por afinidad en la prueba del detector de células HEK 293T SBE-bla

La prueba se llevó a cabo exactamente como se esbozó en el ejemplo 4, prueba h2.

- 5 La prueba se llevó a cabo varias veces para obtener un promedio y un intervalo de valores que se resumen en la tabla 16. Se calculó la media aritmética de CI50 usando el logaritmo de los valores de CI50, y se calculó el intervalo añadiendo y sustrayendo el logaritmo de la desviación típica a partir de la CI50 media, y volviendo a transformar a continuación la CI50. Se reunieron los parámetros de QC de la prueba: los factores Z robustos eran 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 la tabla 16.

Tabla 16

Datos del análisis funcional celular para clones específicos humanos más dAb placebo de vehículo

	CI50 nM		
	Valor medio	Intervalo de CI50 (+/- log DT)	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
Placebo 2 de VH	>	25.119	13

Tabla de concordancia de las secuencias

SEQ ID nº	Número de dominio	Descripción
1	DOM23h-802	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
2	DOM23h-803	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
3	DOM23h-813	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo

ES 2 627 299 T3

4	DOM23h-815	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
5	DOM23h-828	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
6	DOM23h-830	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
7	DOM23h-831	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
8	DOM23h-840	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
9	DOM23h-842	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
10	DOM23h-843	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
11	DOM23h-850	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
12	DOM23h-854	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
13	DOM23h-855	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
14	DOM23h-865	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
15	DOM23h-866	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
16	DOM23h-874	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
17	DOM23h-883	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
18	DOM23h-903	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
19	DOM23m-4	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
20	DOM23m-29	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
21	DOM23m-32	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
22	DOM23m-62	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
23	DOM23m-71	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
24	DOM23m-72	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
25	DOM23m-81	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
26	DOM23m-99	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
27	DOM23m-101	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
28	DOM23m-352	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
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
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
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

ES 2 627 299 T3

		D61R K64F
39	DOM23h-802	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
40	DOM23h-803	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
41	DOM23h-813	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
42	DOM23h-815	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
43	DOM23h-828	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
44	DOM23h-830	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
45	DOM23h-831	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
46	DOM23h-840	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
47	DOM23h-842	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
48	DOM23h-843	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
49	DOM23h-850	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
50	DOM23h-854	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
51	DOM23h-855	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
52	DOM23h-865	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
53	DOM23h-866	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
54	DOM23h-874	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
55	DOM23h-883	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
56	DOM23h-903	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
57	DOM23m-4	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
58	DOM23m-29	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
59	DOM23m-32	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
60	DOM23m-62	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
61	DOM23m-71	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
62	DOM23m-72	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
63	DOM23m-81	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
64	DOM23m-99	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
65	DOM23m-101	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
66	DOM23m-352	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
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

ES 2 627 299 T3

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
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

ES 2 627 299 T3

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

ES 2 627 299 T3

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

ES 2 627 299 T3

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	cebador
186	DOM009	cebador
187	DOM172	cebador
188	DOM173	cebador
189	271-7R1deg CDR1	cebador
190	271-7R2deg CDR2	cebador
191	271-7R3deg CDR3	cebador
192	PE008	cebador
193	271-6164 R	cebador
194	271-6164 deg-F	cebador
195	AS1309	cebador
196	271-6164 NR-F	cebador
197	DOM57	cebador
198	DOM6	cebador
199	DOM23h-271	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
200	DOM23h-271	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
201	DOM23h-271-7	Secuencia de aminoácidos – clon sin tratamiento previo
202	DOM23h-271-7	Secuencia de ácido nucleico – clon sin tratamiento previo
203	DOM23h-855-21	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado en la prueba
204	DOM23h-855-21	Secuencia de aminoácidos – clon madurado en la prueba
205	DOM23h-843-13	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado en la prueba
206	DOM23h-843-13	Secuencia de aminoácidos – clon madurado en la prueba
207	DOM23h-439-20	Secuencia de ácido nucleico – clon madurado en la prueba

ES 2 627 299 T3

208	DOM23h-439-20	Secuencia de aminoácidos – clon madurado en la prueba
209	PEP-26-F	Cebador
210	PeIB NcoVh	Cebador
211	PEP011	Cebador
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*)
215	PEP044	Cebador
216	23h-439-20 CDRH1	Cebador
217	23h-439-20 CDRH2	Cebador
218	23h-439-20 CDRH3	Cebador
219	23h-843-13 CDRH1	Cebador
220	23h-843-13 CDRH2	Cebador
221	23h-843-13 CDRH3	Cebador
222	23h-855-21 CDRH1	Cebador
223	23h-855-21 CDRH2	Cebador
224	23h-855-21 CDRH3	Cebador
225	H1-271-43 R	Cebador
226	H2p1-271-43F	Cebador
227	H2p2-271-43 F	Cebador
228	H3p1-271-43 F	Cebador
229	H3p2-271-43 F	Cebador
230	H3p3-271-43 F	Cebador
231	PEP011VHStopNotIR	Cebador
232	Nco1 VH F	Cebador
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

ES 2 627 299 T3

		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
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	Cebador
254	439 61N SDM F	Cebador
255	439 64R SDM F	Cebador
256	439 61N 64R SDM F	Cebador
257	271 61N SDM F	Cebador
258	271 64R SDM F	Cebador
259	271 61N 64R SDM F	Cebador
260	567 +A rev	Cebador
261	21-23 Fwd	Cebador
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

ES 2 627 299 T3

		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
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 + 48I
289	DOM23h-439-47	Secuencia de aminoácidos - DOM23h-439-42 + 48I
290	DOM23h-439-48	Secuencia de ácido nucleico - DOM23h-439-44 + 48I
291	DOM23h-439-48	Secuencia de aminoácidos - DOM23h-439-44 + 48I

## REIVINDICACIONES

1. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ. ID. nº 267 que tiene hasta 5 sustituciones moderadas de aminoácidos en donde dichas sustituciones moderadas de aminoácidos no están comprendidas en ninguna de las CDR y en donde dicho dominio
- 5 variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII se une al TGFbetaRII humano con una constante de disociación (KD) del equilibrio de aproximadamente 10 pM o menos medida por resonancia de plasmón de superficie.
2. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII como en la reivindicación 1 que tiene la secuencia de SEQ. ID. nº 267.
3. Un polipéptido aislado que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII según una
- 10 cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
4. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido e a TGFbetaRII de ratón y/o TGFbetaRII de *cynomolgus*.
5. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido según una cualquiera de las
- 15 reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido neutraliza la actividad de TGFbeta o inhibe la unión de TGFbeta a TGFbetaRII.
6. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que está unido a una región Fc del anticuerpo que comprende uno o ambos de los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente una región bisagra.
7. Un ácido nucleico aislado que codifica un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o
- 20 polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una molécula de ácido nucleico aislado según la reivindicación 7, que comprende al menos una molécula de ácido nucleico de SEQ. ID. nº 266.
9. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8.
- 25 10. Una célula anfitriona que comprende un ácido nucleico o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
11. Un método de producción de un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el método el mantenimiento de una célula anfitriona según la reivindicación 9 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico o vector, por lo cual se produce un polipéptido que comprende una variable única de inmunoglobulina.
- 30 12. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su empleo como medicamento.
13. Una composición farmacéutica que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
14. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido según una cualquiera de las
- 35 reivindicaciones 1 a 6 para su empleo en elegir como objetivo el cáncer al modular la señalización del TGFbeta en la angiogenia tumoral.
15. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TGFbetaRII o polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición farmacéutica según la reivindicación 13, para su empleo en el tratamiento del cáncer, fibrosis hística, tal como la fibrosis pulmonar, incluida la fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis hepática,
- 40 incluidas la cirrosis y la hepatitis crónica; artritis reumatoide; trastornos oculares; fibrosis de la piel, incluido el queloide de la piel, y la contractura de Dupuytren; fibrosis renal tales como la nefritis y nefrosclerosis; cicatrización de heridas; reducción de cicatrices; y una enfermedad vascular, tal como la restenosis.
16. Utilización de un dominio variable único anti-TGFbetaRII o polipéptido según una cualquiera de las
- 45 reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento para su empleo en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo siguiente: cáncer, fibrosis hística, tal como la fibrosis pulmonar, incluida la fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis hepática, incluidas la cirrosis y la hepatitis crónica; artritis reumatoide; trastornos oculares; fibrosis de la piel, incluido el queloide de la piel, y la contractura de Dupuytren; fibrosis renal tales como la nefritis y nefrosclerosis, cicatrización de heridas; reducción de cicatrices; y una enfermedad vascular, tal como la restenosis.