

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2970441

DAL TITOLO:

“POLIPEPTIDI CONTENENTI Fc AGLICOSILATO”

*** **

Descrizione

Stato dell'arte

[0001] IL-2 lega tre subunità di recettori transmembrana: IL-2R β e IL-2R γ che assieme attivano eventi di segnalazione intracellulare al legame a IL-2, e CD25 (IL-2R α) che serve per stabilizzare l'interazione tra IL-2 e IL-2R $\beta\gamma$. I segnali consegnati da IL-2R $\beta\gamma$ includono quelli delle vie della PI3-chinasi, Ras-MAP-chinasi, e di STAT5.

[0002] I linfociti T richiedono l'espressione di CD25 per rispondere alle scarse concentrazioni di IL-2 che esistono tipicamente nei tessuti. I linfociti T che esprimono CD25 includono linfociti T sia FOXP3+ regolatori (linfociti Treg), che sono essenziali per sopprimere l'infiammazione autoimmune, sia linfociti T FOXP3- che sono stati attivati per esprimere CD25. I linfociti T FOXP3- CD25+ effettori (Teff) possono essere cellule CD4+ o CD8+, entrambe le quali possono contribuire a infiammazione, autoimmunità, rigetto di trapianto d'organo o malattia del trapianto contro l'ospite. La segnalazione di STAT5 stimolata da IL-2 è fondamentale per la crescita e la sopravvivenza normale dei linfociti T-reg e per l'espressione elevata di FOXP3.

[0003] Nella comproprietaria WO 2010/085495, descriviamo l'uso di muteine di IL-2 per espandere o stimolare in maniera

preferenziale linfociti Treg. Quando somministrate a un soggetto, l'effetto sui linfociti Treg è utile per trattare malattie infiammatorie e autoimmuni. Sebbene le muteine di IL-2 ivi descritte siano utili per espandere i linfociti Treg rispetto ai Teff *in vivo*, era desiderabile creare muteine di IL-2 che avessero peculiarità ottimali per un agente terapeutico per uso umano.

[0004] WO 2011/076781 descrive un dominio Fc che è un mutante che impedisce la glicosilazione in posizione 297 sul dominio Fc.

Sommario

[0005] Sono qui descritte muteine di IL-2 che sono disponibili per la producibilità a resa elevata e hanno attività farmacologica ottimizzata. Nel tentativo di produrre un agente terapeutico umano esemplificativo a base di muteine di IL-2, si è presentata una serie di osservazioni inattese e imprevedibili. Le muteine di IL-2 qui descritte sono il risultato di tale tentativo.

[0006] Le muteine di IL-2 qui descritte hanno un numero trascurabile di alterazioni rispetto a IL-2, il che quindi diminuisce la probabilità di creare una risposta immunitaria nei confronti della muteina di IL-2 e/o di IL-2 endogena, tuttavia mantengono espansione e attivazione preferenziale dei Treg. Inoltre, la muteina di IL-2 può essere fusa a una molecola, ad esempio un Fc di anticorpo, che aumenta l'emivita sierica quando somministrata a un soggetto. Muteine di IL-2 hanno una emivita sierica breve (da 3 a 5 ore per iniezione sottocutanea). Fusioni esemplificative di Fc e muteine di IL-2 qui descritte hanno una emivita nell'uomo di almeno 1 giorno, almeno 3 giorni, almeno 5 giorni,

almeno 10 giorni, almeno 15 giorni, almeno 20 giorni, o almeno 25 giorni. Questo effetto sulla farmacocinetica delle muteine di IL-2 permette un dosaggio ridotto o meno frequente dell'agente terapeutico muteina di IL-2.

[0007] Inoltre, quando si crea una molecola farmaceutica di grandi dimensioni, si deve tenere conto della capacità di produrre la molecola di grandi dimensioni in grandi quantità, minimizzando al contempo l'aggregazione e massimizzando la stabilità della molecola. Le molecole di fusione muteina di IL-2-Fc dimostrano tali peculiarità.

[0008] In aggiunta, la proteina di fusione muteina di IL-2-Fc contiene una regione Fc di IgG1. Quando è desiderabile abolire le funzioni effettrici di IgG1 (ad esempio, attività ADCC), è stato trovato che la mutazione dell'asparagina in posizione 297 in glicina (N297G; schema di numerazione EU) forniva efficienza di purificazione e proprietà biofisiche nettamente migliorate rispetto ad altre mutazioni che determinano una aglicosilazione di Fc di IgG1. Le cisteine sono generalmente ingegnerizzate nell'Fc per consentire legami disolfuro che aumentavano la stabilità della molecola contenente Fc aglicosilato. L'utilità dell'Fc aglicosilato va oltre il contesto della fusione muteina di IL-2-Fc. Pertanto, sono qui fornite molecole contenenti Fc, fusioni di Fc e anticorpi, comprendenti una sostituzione N297G e una sostituzione di residui aggiuntivi in cisteina.

[0009] In particolare, l'invenzione fornisce un polipeptide comprendente una regione Fc di un anticorpo IgG1 umano in cui detta

regione Fc comprende una mutazione N297G, usando lo schema di numerazione EU, e detta regione Fc di una IgG1 umana ha almeno il 90% di identità con la sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:3 o comprende la sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:4; e inoltre in cui A287 e L306; V259 e L306; R292 e V302; o V323 e 1332, usando lo schema di numerazione EU, della sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 sono sostituiti con cisteina.

[0010] Viene altresì fornito un anticorpo o proteina di fusione Fc comprendente una regione Fc della prima forma di realizzazione.

[0011] Viene altresì fornito un acido nucleico codificante un polipeptide dell'invenzione.

[0012] Viene altresì fornito un vettore di espressione o cellula ospite comprendente l'acido nucleico dell'invenzione.

[0013] Viene altresì fornita una cellula ospite comprendente il vettore di espressione dell'invenzione in cui la cellula ospite è una cellula ospite di mammifero.

[0014] L'invenzione fornisce altresì un metodo di produzione di una molecola contenente Fc di IgG1 aglicosilata, detto metodo comprendendo:

a) esprimere un acido nucleico codificante un polipeptide della prima forma di realizzazione in una coltura cellulare di mammifero;
e

b) raccogliere la molecola contenente Fc di IgG1 aglicosilata da detta coltura.

Breve descrizione delle figure

[0015]

Fig. 1. In un saggio di stimolazione a breve termine, l'omodimerizzazione mediante fusione al C-terminale di Fc di IgG non altera l'attività di muteine di IL-2 con potenza ridotta e con affinità elevata per CD25.

Fig. 2A e Fig. 2B. Le muteine di IL-2 con le mutazioni indicate e fuse al C-terminale di un lato di un eterodimero di Fc sono state testate per la loro capacità di stimolare la fosforilazione di STAT5 in linfociti T. Queste muteine contenevano altresì tre mutazioni che conferivano elevata affinità per CD25 (V69A, N71R, Q74P). La loro attività è stata confrontata a tre forme di IL-2 senza fusione a Fc (simboli vuoti): IL-2 WT, HaWT (affinità elevata per CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P), e HaD (affinità elevata per CD25 e attività di segnalazione ridotta) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D). Le risposte di fosfo-STAT5 sono mostrate per i linfociti T sottoposti a gating FOXP3⁺CD4⁺ e FOXP3⁻CD4⁺.

Fig. 3. Proliferazione di sottotipi di linfociti T in risposta a titolazioni di muteine di IL-2 fuse a eterodimero-Fc. L'attività delle proteine di fusione è stata confrontata a tre forme di IL-2 senza fusione a Fc (simboli vuoti): IL-2 WT, HaWT (affinità elevata per CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P), e HaD (affinità elevata per CD25 e attività di segnalazione ridotta) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D)

Fig. 4. Proliferazione di cellule NK in risposta a titolazioni di muteine di IL-2 fuse a eterodimero-Fc. L'attività delle proteine di fusione è stata confrontata a tre forme di IL-2 senza fusione a Fc (simboli vuoti): IL-2 WT, HaWT (affinità elevata per CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P), e HaD (affinità elevata per CD25 e attività di segnalazione ridotta) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D)

Fig. 5. Proliferazione di sottotipi di linfociti T in risposta a titolazioni di muteine di IL-2 fuse a omodimero-Fc N297G. L'attività delle muteine di Fc è stata confrontata con IL-2 WT (cerchi vuoti) e Fc.WT (cerchi pieni). Le mutazioni che conferiscono elevata affinità per CD25 (HaMut1) erano V69A e Q74P.

Fig. 6. Proliferazione di cellule NK in risposta a titolazioni di muteine di IL-2 fuse a omodimero-Fc N297G. L'attività delle muteine di Fc è stata confrontata con IL-2 WT (cerchi vuoti) e Fc.WT (cerchi pieni).

Fig. 7A e Fig. 7B. Le muteine di IL-2.Fc senza mutazioni che conferiscono affinità elevata per CD25 promuovono l'espansione dei Treg e la upregolazione di FOXP3 in topi umanizzati.

Fig. 8. Dosi settimanali basse (0,5 µg per animale) di muteine di IL-2.Fc promuovono l'espansione dei Treg e la upregolazione di FOXP3 in topi umanizzati, con attività migliore osservata per Fc.V91K rispetto a Fc.N88D e Fc.WT.

Fig. 9 Fc.V91K e Fc.N88D rimangono sulla superficie di linfociti T attivati tramite associazione con CD25.

Descrizione dettagliata delle forme di realizzazione preferite

[0016] I titoli delle sezioni qui utilizzati sono esclusivamente a scopo organizzativo e non devono essere interpretati come limitativi dell'argomento oggetto descritto.

[0017] Tecniche standard possono essere usate per DNA ricombinante, sintesi di oligonucleotidi, coltura di tessuti e trasformazione, purificazione di proteine, ecc. Le reazioni enzimatiche e le tecniche di purificazione possono essere eseguite secondo le istruzioni dei produttori o come comunemente realizzato nell'arte o qui descritto. Le seguenti procedure e tecniche possono essere generalmente eseguite secondo metodi convenzionali ben noti nell'arte e come descritto in vari riferimenti generali e più specifici che sono citati e discussi nella descrizione. Si veda, ad esempio, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Salvo vengano fornite specifiche definizioni, la nomenclatura usata in associazione a, e le procedure di laboratorio e tecniche di, chimica analitica, chimica organica e chimica medicinale e farmaceutica descritte qui sono quelle ben note e comunemente usate nell'arte. Le tecniche standard possono essere usate per sintesi chimica, analisi chimiche, preparazione farmaceutica, formulazione e rilascio, e trattamento dei pazienti.

IL-2

[0018] Le muteine di IL-2 qui descritte sono varianti della IL-2 umana selvatica. Come qui utilizzato, "IL-2 umana selvatica", "IL-2

selvatica” o “IL-2 WT” significheranno il polipeptide avente la seguente sequenza amminoacidica:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF
YMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR
PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTL
T

Dove X è C, S, V, o A (SEQ ID NO:2).

[0019] Le varianti possono contenere una o più sostituzioni, delezioni o inserzioni all’interno della sequenze amminoacidiche di IL-2 selvatica. I residui sono indicati qui con il codice a una lettera degli amminoacidi seguito dalla posizione dell’amminoacido in IL-2, ad esempio K35 è il residuo di lisina in posizione 35 di SEQ ID NO:2. Le sostituzioni sono indicate qui con il codice a una lettera degli amminoacidi seguito dalla posizione dell’amminoacido in IL-2 seguito dal codice a una lettera dell’amminoacido sostituyente, ad esempio K35A è il residuo di lisina in posizione 35 di SEQ ID NO:2 con un residuo di alanina.

Muteine di IL-2

[0020] Sono qui descritte muteine di IL-2 che stimolano linfociti T regolatori (Treg) in maniera preferenziale. Come qui utilizzato “stimola linfociti T regolatori in maniera preferenziale” significa che la muteina promuove la proliferazione, sopravvivenza, attivazione e/o funzione di linfociti T CD3+FoxP3+ T rispetto a linfociti T CD3+FoxP3-. Metodi per misurare la capacità di stimolare Treg in maniera preferenziale possono essere misurati mediante citometria a flusso di leucociti del sangue

periferico, in cui vi è un aumento osservato della percentuale di linfociti Y FOXP3+CD4+ tra i linfociti T CD4+ totali, un aumento della percentuale di linfociti Y FOXP3+CD8+ tra i linfociti T CD8+ totali, un aumento della percentuale di linfociti T FOXP3+ rispetto alle cellule NK e/o un aumento maggiore del livello di espressione di CD25 sulla superficie di linfociti T FOXP3+ rispetto all'aumento dell'espressione di CD25 su altri linfociti T. La crescita preferenziale di linfociti Treg può essere rilevata anche come rappresentazione aumentata del DNA del promotore di FOXP3 demetilato (ovvero la regione demetilata specifica dei Treg, o TSDR) rispetto ai geni CD3 demetilati nel DNA estratto dal sangue intero, come rilevato mediante sequenziamento dei prodotti della reazione a catena della polimerasi (PCR) da DNA genomico trattato con bisolfiti (J. Sehouli, et al. 2011. Epigenetics 6:2, 236-246).

[0021] Le muteine di IL-2 che stimolano in maniera preferenziale linfociti Treg aumentano il rapporto dei linfociti T CD3+FoxP3+ rispetto ai linfociti T CD3+FoxP3- in un soggetto o in un campione di sangue periferico di almeno 30%, almeno 40%, almeno 50%, almeno 60%, almeno 70%, almeno 80%, almeno 90%, almeno 100%, almeno 150%, almeno 200%, almeno 300%, almeno 400%, almeno 500%, almeno 600%, almeno 700%, almeno 800%, almeno 900%, o almeno 1000%.

[0022] Le muteine di IL-2 della divulgazione includono, ma senza limitazione, muteine di IL-2 comprendenti la sostituzione V91K o N88D nella sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:2. Una muteina di IL-2 della divulgazione è presentata in SEQ ID NO:1. È particolarmente

preferita la sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:1 comprendente una sostituzione C125A. Sebbene possa essere vantaggioso ridurre il numero di ulteriori mutazioni nella sequenza di IL-2 selvatica, l'invenzione include muteine di IL-2 aventi troncamenti o inserzioni aggiuntive, delezioni o sostituzioni oltre alla sostituzione V91K o N88D, a condizione che dette muteine mantengano l'attività di stimolazione preferenziale di Treg. Pertanto, aspetti della divulgazione includono muteine di IL-2 che stimolano in maniera preferenziale linfociti Treg e comprendono una sequenza amminoacidica avente una V91K o N88D che è identica almeno il per il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, o almeno il 99% alla sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:2. In aspetti particolarmente preferiti, tali muteine di IL-2 comprendono una sequenza amminoacidica che è identica almeno il per il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, o almeno 99% alla sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:2.

[0023] Per sequenze amminoacidiche, identità e/o similarità di sequenza è determinata usando tecniche standard note nell'arte, incluso, ma senza limitazione, l'algoritmo di identità di sequenza locale di Smith e Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, l'algoritmo di allineamento di identità di sequenza di Needleman e Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, il metodo di ricerca della similarità di Pearson e Lipman, 1988, Proc. Nat.

Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, mediante implementazioni computerizzate di questi algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA nel Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Gruppo, 575 Science Drive, Madison, WI), il programma di sequenza Best Fit descritto da Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, preferibilmente utilizzando le impostazioni predefinite, o mediante ispezione. Preferibilmente, la percentuale di identità è calcolata mediante FastDB con i seguenti parametri: penalità per appaiamento errato di 1; penalità per gap di 1; penalità per dimensione del gap di 0,33; e penalità di unione di 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pagg.127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

[0024] Un esempio di un algoritmo utile è PILEUP. PILEUP crea un allineamento di sequenze multiple da un gruppo di sequenze correlate utilizzando allineamenti progressivi a coppie. Può anche tracciare un albero che mostra le relazioni di raggruppamento utilizzate per creare l'allineamento. PILEUP utilizza una semplificazione del metodo di allineamento progressivo di Feng e Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; il metodo è simile a quello descritto da Higgins e Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Parametri utili per PILEUP incluso il peso predefinito dei gap di 3,00, un peso di lunghezza del gap predefinito di 0,10, e gap a interruzione pesata.

[0025] Un altro esempio di un algoritmo utile è l'algoritmo BLAST, descritto in: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al.,

1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; e Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Un programma BLAST particolarmente utile è il programma WU-BLAST-2 che è stato ottenuto da Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 utilizza diversi parametri di ricerca, la maggior parte dei quali è preferibilmente impostata sui valori predefiniti. I parametri regolabili sono impostati ai seguenti valori: lunghezza di sovrapposizione=1, frazione di sovrapposizione=0,125, soglia per parola (T)=11. I parametri HSP S e HSP S2 sono valori dinamici e sono stabiliti dal programma stesso in base alla composizione della particolare sequenza e composizione del particolare database rispetto al quale viene cercata la sequenza di interesse; tuttavia, i valori possono essere regolati per aumentare la sensibilità.

[0026] Un ulteriore algoritmo utile è gapped BLAST come riportato da Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. Gapped BLAST usa punteggi di sostituzione di BLOSUM-62; parametro T di soglia impostato a 9; il metodo a due hit per innescare estensioni senza gap, carica a lunghezze di gap di k un costo di $10+k$; X_u impostato a 16, e X_g impostato a 40 per stadio di ricerca su banca dati e a 67 per lo stadio di emissione degli algoritmi. Allineamenti con gap sono innescati da un punteggio corrispondente a circa 22 bit.

[0027] Sebbene il sito o la regione per introduzione di una variazione nella sequenza amminoacidica possa essere predeterminato, non è necessario che la natura della mutazione sia di per sé

predeterminata. Per esempio, al fine di ottimizzare le prestazioni di una mutazione su un dato sito, può essere condotta mutagenesi random sul codone o la regione bersaglio e la muteina di IL-2 espressa sottoposta a screening per la combinazione ottimale dell'attività desiderata. Tecniche per eseguire mutazioni di sostituzione in siti predeterminati di DNA aventi una sequenza nota sono ben note, ad esempio, mutagenesi con primer di M13 e mutagenesi mediante PCR. Lo screening dei mutanti può essere realizzato usando i saggi qui descritti, per esempio.

[0028] Le sostituzioni amminoacidiche sono tipicamente di singoli residui; le inserzioni saranno solitamente dell'ordine di circa da uno (1) a circa venti (20) residui amminoacidici, sebbene possano essere tollerate inserzioni considerevolmente più ampie. Delezioni variano da circa uno (1) a circa venti (20) residui amminoacidici, sebbene in alcuni casi le delezioni possano essere molto più ampie.

[0029] Sostituzioni, delezioni, inserzioni o qualsiasi loro combinazione possono essere usate per arrivare a un derivato o variante finale. In generale, queste variazioni sono effettuate su pochi amminoacidi per minimizzare l'alterazione della molecola, in particolare l'immunogenicità e la specificità della proteina di legame all'antigene. Tuttavia, variazioni più ampie possono essere tollerate in determinate circostanze. Sostituzioni conservative sono generalmente effettuate in accordo con il seguente diagramma raffigurato come TABELLA 1.

Tabella 1

Residuo originale	Sostituzioni esemplificative
--------------------------	-------------------------------------

Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser; Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Variazioni sostanziali nella funzione o nell'identità immunologica sono effettuate selezionando le sostituzioni che sono meno conservative rispetto a quelle mostrate in TABELLA 1. Per esempio, possono essere effettuate sostituzioni che influenzano più significativamente: la struttura della catena dorsale polipeptidica nell'area dell'alterazione, per esempio

la struttura ad alfa elica o foglietto beta; la carica o idrofobicità della molecola sul sito bersaglio; o l'ingombro della catena laterale. Le sostituzioni che ci si aspetta producano in generale le variazioni maggiori nelle proprietà del polipeptide sono quelle in cui (a) un residuo idrofilo, ad esempio, serile o treonile, è sostituito al posto di (o da) un residuo idrofobico, ad esempio, leucile, isoleucile, fenilalanile, valile o alanile; (b) una cisteina o prolina è sostituita al posto di (o da) qualsiasi altro residuo; (c) un residuo avente una catena laterale elettropositiva, ad esempio, lisile, arginile, o istidile, è sostituito al posto di (o da) un residuo elettronegativo, ad esempio, glutamile o aspartile; o (d) un residuo avente una catena laterale ingombrante, ad esempio, fenilalanina, è sostituito al posto di (o da) uno non avente catena laterale, ad esempio glicina.

[0030] Le varianti presentano tipicamente la stessa attività biologica qualitativa e provocheranno la stessa risposta immunitaria dell'analogo presente in natura, sebbene siano selezionate altresì varianti per modificare le caratteristiche della muteina di IL-2 ove necessario. In alternativa, la variante può essere progettata in modo che l'attività biologica della muteina di IL-2 sia alterata. Per esempio, siti di glicosilazione possono essere alterati o rimossi, come qui discusso.

Muteine di IL-2 aventi emivita sierica estesa

[0031] Dato che le muteine di IL-2 qui descritte espandono i Treg, preferibilmente, rispetto alle linfociti Teff o NK, ci si attende che il profilo di sicurezza, quando somministrate a un paziente, differisca da quello della IL-2 o PROLEUCHINA selvatica. Gli effetti collaterali associati a IL-

2 o PROLEUCHINA selvatica includono sintomi influenzali, brividi, rigidità, artralgia, febbre, rossore, prurito, reazioni al sito di iniezione, ipotensione, diarrea, nausea, ansia, confusione e depressione. Le muteine di IL-2 qui descritte possono essere alterate per includere o essere fuse a molecole che estendono l'emivita sierica della muteina senza aumentare il rischio che tale estensione dell'emivita aumenti la probabilità o l'intensità di un evento effetto collaterale o avverso in un paziente. Il dosaggio sottocutaneo di una tale muteina con emivita sierica estesa può permettere la copertura prolungata del bersaglio con esposizione massima sistemica inferiore (C_{max}). L'emivita sierica estesa può permettere un regime posologico inferiore o meno frequente della muteina.

[0032] L'emivita sierica delle muteine di IL-2 qui descritte può essere estesa mediante essenzialmente qualsiasi metodo noto nell'arte. Tali metodi includono alterare la sequenza della muteina di IL-2 per includere un peptide che lega il recettore Fc γ neonatale o lega una proteina avente emivita sierica estesa, ad esempio IgG o albumina sierica umana. In altre forme di realizzazione, la muteina di IL-2 può essere fusa a un polipeptide che conferisce emivita estesa sulla molecola di fusione. Tali polipeptidi includono un Fc di IgG o altri polipeptidi che lega il recettore Fc γ neonatale, albumina sierica umana, o polipeptidi che legano una proteina avente emivita sierica estesa. In forme di realizzazione preferite, la muteina di IL-2 può essere fusa a una molecola Fc di IgG.

[0033] La muteina di IL-2 può essere fusa all'N-terminale o al C-terminale della regione Fc di IgG. Come mostrato negli Esempi, la fusione al C-terminale della regione Fc di IgG mantiene l'attività della muteina di IL-2 in misura maggiore rispetto a quando fusa all'N-terminale dell'Fc di IgG.

[0034] Viene qui divulgato un dimero comprendente due polipeptidi di fusione a Fc creato fondendo una muteina di IL-2 alla regione Fc di un anticorpo. Il dimero può essere realizzato, per esempio, inserendo una fusione genica codificante la proteina di fusione in un vettore di espressione appropriato, esprimendo la fusione genica in cellule ospiti trasformate con il vettore di espressione ricombinante e consentendo alla proteina di fusione espressa di assemblarsi in modo molto simile a molecole anticorpali, su cui si formano legami disolfuro intercatenari tra le porzioni funzionali Fc per produrre il dimero.

[0035] Il termine "polipeptide Fc" o "regione Fc", come qui utilizzato, include le forme native e di muteina di polipeptidi derivati dalla regione Fc di un anticorpo. Sono incluse forme troncate di tali polipeptidi contenenti la regione cerniera che promuove la dimerizzazione. In determinate forme di realizzazione, la regione Fc comprende un dominio CH2 e CH3 di anticorpo. Oltre all'emivita sierica estesa, le proteine di fusione comprendenti frazioni Fc (e oligomeri formati da esse) offrono il vantaggio di una facile purificazione mediante cromatografia di affinità su colonne di proteina A o proteina G. Le regioni Fc dell'invenzione sono derivate da IgG1 umana. Qui, residui specifici all'interno di Fc sono

identificati attraverso la posizione. Tutte le posizioni in Fc sono basate sullo schema di numerazione EU.

[0036] Una delle funzioni della porzione Fc di un anticorpo è di comunicare col sistema immunitario quando l'anticorpo lega il suo bersaglio. Questa viene considerata "funzione effettrice". La comunicazione determina citotossicità cellulare dipendente da anticorpi (ADCC), fagocitosi cellulare dipendente da anticorpi (ADCP) e/o citotossicità dipendente dal complemento (CDC). ADCC e ADCP sono mediate attraverso il legame di Fc a recettori di Fc sulla superficie di cellule del sistema immunitario. CDC è mediata attraverso il legame del Fc con proteine del sistema del complemento, ad esempio C1q.

[0037] Le sottoclassi di IgG variano per la loro capacità di mediare le funzioni effettrici. Per esempio IgG1 è di molto superiore a IgG2 e IgG4 nel mediare ADCC e CDC.

[0038] La funzione effettrice di un anticorpo può essere aumentata o diminuita introducendo una o più mutazioni nell'Fc. Sono qui descritte proteine di fusione di muteina di IL-2 Fc aventi un Fc ingegnerizzato per aumentare la funzione effettrice (U.S. 7,317,091 e Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009). Molecole Fc di IgG1 aventi funzione effettrice aumentata includono quelle aventi le seguenti sostituzioni:

S239D/I332E

S239D/A330S/I332E

S239D/A330L/I332E

S298A/D333A/K334A
P247I/A339D
P247I/A339Q
D280H/K290S
D280H/K290S/S298D
D280H/K290S/S298V
F243L/R292P/Y300L
F243L/R292P/Y300L/P396L
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
G236A/S239D/I332E
K326A/E333A
K326W/E333S
K290E/S298G/T299A
K290N/S298G/T299A
K290E/S298G/T299A/K326E
K290N/S298G/T299A/K326E

[0039] Un altro metodo per aumentare la funzione effettrice di proteine contenenti Fc di IgG è mediante riduzione della fucosilazione dell'Fc. La rimozione del fucosio centrale dagli oligosaccaridi biantennari di tipo complesso attaccati all'Fc ha aumentato di molto la funzione effettrice ADCC senza alterare il legame all'antigene o la funzione effettrice CDC. Sono note molte modalità per ridurre o abolire la fucosilazione di molecole contenenti Fc, ad esempio anticorpi. Queste includono l'espressione ricombinante in determinate linee cellulari di

mammifero inclusa una linea cellulare FUT8 knockout, linea CO variante Lec13, linea cellulare di ibridoma di ratto YB2/0, una linea cellulare comprendente un piccolo RNA interferente specificamente contro il gene FUT8, e una linea cellulare coesprimente β -1,4-*N*-acetilglucosaminiltransferasi III e Golgi α -mannosidasi II. In alternativa, la molecola contenente Fc può essere espressa in una cellula non di mammifero come una cellula vegetale, di lievito, o una cellula procariotica, ad esempio di *E. coli*.

[0040] Sono qui divulgate proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2 che comprendono un Fc ingegnerizzato per ridurre la funzione effettrice. Molecole Fc aventi funzione effettrice ridotta possono includere quelle aventi le seguenti sostituzioni:

N297A o N297Q (IgG1)

L234A/L235A (IgG1)

V234A/G237A (IgG2)

L235A/G237A/E318A (IgG4)

H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)

C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)

C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)

L234F/L235E/P331S (IgG1)

S267E/L328F (IgG1)

[0041] È noto che IgG1 umana ha un sito di glicosilazione su N297 (sistema di numerazione EU) e la glicosilazione contribuisce alla funzione effettrice di anticorpi IgG1. Una sequenza esemplificativa di

IgG1 è fornita in SEQ ID NO:3. I gruppi hanno N297 mutato in un tentativo di produrre anticorpi aglicosilati. Le mutazioni si sono concentrate sulla sostituzione di N297 con amminoacidi che assomigliano ad asparagina nella natura fisiologica, come glutammina (N297Q) oppure alanina (N297A) che mina le asparagine senza gruppi polari.

[0042] Come qui utilizzato, “anticorpo aglicosilato” oppure “Fc aglicosilato” si riferisce allo stato di glicosilazione del residuo in posizione 297 dell’Fc. Un anticorpo o altra molecola può contenere glicosilazione su una o più altre posizioni ma può essere ancora considerata un anticorpo aglicosilato o proteina di fusione a Fc aglicosilata.

[0043] Nel nostro tentativo di produrre Fc di IgG1 senza funzione effettrice, è stato scoperto che la mutazione dell’amminoacido N297 di IgG1 umana in glicina, ovvero N297G, fornisce una efficienza di purificazione e proprietà biofisiche di molto superiori rispetto ad altre sostituzioni amminoacidiche su quel residuo. Si veda l’Esempio 8. Pertanto, la proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 comprende un Fc di IgG1 umana avente una sostituzione N297G. L’Fc comprendente la sostituzione N297G è utile in qualsiasi contesto in cui una molecola comprende un Fc di IgG1 umana, e non è limitato all’uso nel contesto di una fusione di Fc-muteina di IL-2. In determinati aspetti, un anticorpo comprende l’Fc avente una sostituzione N297G.

[0044] Un Fc comprendente un Fc di IgG1 umana avente la mutazione N297G può comprendere anche ulteriori inserzioni, delezioni e sostituzioni. In determinati aspetti, l’Fc di IgG1 umana comprende la

sostituzione N297G ed è identico almeno al 90%, identico almeno al 91%, identico almeno al 92%, identico almeno al 93%, identico almeno al 94%, identico almeno al 95%, identico almeno al 96%, identico almeno al 97%, identico almeno al 98%, o identico almeno al 99% alla sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:3. In un aspetto particolarmente preferito, il residuo di lisina al C-terminale è sostituito o deletato. La sequenza amminoacidica di IgG1 umana comprendente la sostituzione N297G e la delezione della lisina al C-terminale è presentata in SEQ ID NO:4.

[0045] È stato mostrato che molecole contenenti Fc di IgG1 aglicosilate sono meno stabili rispetto alle molecole contenenti Fc di IgG1 glicosilate. La regione Fc è ulteriormente ingegnerizzata per aumentare la stabilità della molecola aglicosilata. Due o più amminoacidi sono sostituiti in cisteina per formare legami disolfuro nello stato dimerico. I residui V259, A287, R292, V302, L306, V323, o 1332 della sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:3 possono essere sostituiti con cisteina. Coppie specifiche di residui sono sostituite in modo da formare preferenzialmente un legame disolfuro l'una con l'altra, limitando o impedendo in tal modo lo scrambling del legame disolfuro. Le coppie sono A287C e L306C, V259C e L306C, R292C e V302C, e V323C e I332C.

[0046] Sono qui fornite molecole contenenti Fc in cui due o più tra i residui V259, A287, R292, V302, L306, V323, o 1332 sono sostituiti con cisteina, in particolare quelli comprendenti le sostituzioni A287C e

L306C, V259C e L306C, R292C e V302C, o V323C e I332C.

[0047] Molecole esemplificative contenenti Fc comprendono:

Fc di IgG1 umana con sostituzioni N297G, A287C, L306C e

delezione del K al C-terminale

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLDWLNGLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:39)

Fc di IgG1 umana con sostituzioni N297G, V259C, L306C e

delezione del K al C-terminale

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLDWLNGLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:40)

Fc di IgG1 umana con sostituzioni N297G, R292C, V302C e

delezione del K al C-terminale

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
YRCVSVLTVLHLDWLNGLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:41)

Fc di IgG1 umana con sostituzioni N297G, A287C, L306C

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLDWLNGLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:42)

Fc di IgG1 umana con sostituzioni N297G, V259C, L306C

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLDWLNGLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:43)

Fc di IgG1 umana con sostituzioni N297G, R292C, V302C

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:44)

[0048] Mutazioni aggiuntive che possono essere realizzate all'Fc di IgG1 includono quelle che facilitano la formazione di eterodimeri tra polipeptidi contenenti Fc. In alcune forme di realizzazione, la regione Fc è ingegnerizzata per creare "protuberanze" e "fori" che facilitano la formazione di eterodimeri con due diverse catene polipeptidiche contenenti Fc quando co-espresse in una cellula. U.S. 7,695,963. La regione Fc può essere alterata per usare indirizzamento elettrostatico per incoraggiare la formazione di eterodimeri scoraggiando al contempo la formazione di omodimeri di due diverse catene polipeptidiche contenenti Fc quando co-espresse in una cellula. WO 09/089,004, che è qui incorporato come riferimento nella sua interezza. Fc eterodimerici preferiti includono quelli in cui una catena dell'Fc comprende sostituzioni D399K e E356K e l'altra catena dell'Fc comprende sostituzioni K409D e K392D. Una catena dell'Fc comprende sostituzioni D399K, E356K, e E357K e l'altra catena dell'Fc comprende sostituzioni K409D, K392D, e K370D.

[0049] Può essere vantaggioso che la proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 sia monomerica, ovvero contenga solamente una singola molecola di muteina di IL-2. In tali casi, la regione Fc della proteina di fusione può contenere una o più mutazioni che facilitano la formazione di eterodimeri. La proteina di fusione è co-espresa con una regione Fc avente mutazioni reciproche a quelle nel polipeptide di fusione di Fc-

muteina di IL-2 ma priva di muteina di IL-2. Quando si forma l'eterodimero dei due polipeptidi contenenti Fc, la proteina risultante comprende solamente una singola muteina di IL-2.

[0050] Un altro metodo di creare una proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 monomerica è fondere la muteina di IL-2 a un Fc monomerico, ovvero una regione Fc che non dimerizza. Fc monomerici stabili comprendono mutazioni che scoraggiano la dimerizzazione e che stabilizzano la molecola nella forma monomerica. Fc monomerici preferiti sono divulgati in WO 2011/063348. Le proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2 possono comprendere un Fc comprendente amminoacidi carichi negativamente nelle posizioni 392 e 409 insieme a una sostituzione di treonina su Y349, L351, L368, V397, L398, F405, o Y407.

[0051] La proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 può comprendere un linker tra l'Fc e la muteina di IL-2. Nell'arte sono noti molti diversi polipeptidi linker e possono essere usati nel contesto di una proteina di fusione di Fc e muteina di IL-2. In forme di realizzazione preferite, la proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 comprende una o più copie di un peptide che consiste in GGGGS (SEQ ID NO:5), GGNGT (SEQ ID NO:6), o YGNGT (SEQ ID NO:7) tra l'Fc e la muteina di IL-2. La regione del polipeptide tra la regione Fc e la regione della muteina di IL-2 può comprendere una singola copia di GGGGS (SEQ ID NO:5), GGNGT (SEQ ID NO:6), o YGNGT (SEQ ID NO:7). Come qui mostrato, i linker GGNGT (SEQ ID NO:6) o YGNGT (SEQ ID NO:7) sono glicosilati quando espressi nelle cellule appropriate e tale glicosilazione può aiutare

a stabilizzare la proteina in soluzione e/o quando somministrata *in vivo*. Pertanto, una proteina di fusione di muteina di IL-2 può comprendere un linker glicosilato tra la regione Fc e la regione della muteina di IL-2.

[0052] Si Contempla che il linker glicosilato possa essere utile quando posto nel contesto di un polipeptide. Sono qui forniti polipeptidi comprendenti GGNGT (SEQ ID NO:6) o YGNGT (SEQ ID NO:7) inserito nella sequenza amminoacidica del polipeptide o a sostituire uno o più amminoacidi all'interno della sequenza amminoacidica del polipeptide. GGNGT (SEQ ID NO:6) o YGNGT (SEQ ID NO:7) possono essere inseriti in un'ansa della struttura terziaria del polipeptide. In altre forme di realizzazione, uno o più amminoacidi di un'ansa sono sostituiti con GGNGT (SEQ ID NO:6) o YGNGT (SEQ ID NO:7).

[0053] La porzione C-terminale dell'Fc e/o la porzione N-terminale della muteina di IL-2 può contenere una o più mutazioni che alterano il profilo di glicosilazione della proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 quando espressa in cellule di mammifero. La muteina di IL-2 può comprendere inoltre una sostituzione T3, ad esempio T3N o T3A. La muteina di IL-2 può comprendere inoltre una sostituzione S5, come S5T

[0054] Modifiche covalenti della muteina di IL-2 e delle proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2 possono rientrare nella portata di questa invenzione, e sono in generale, ma non sempre, realizzate dopo la traduzione. Per esempio, svariati tipi di modifiche covalenti della muteina di IL-2 e della proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 sono introdotte nella molecola mediante reazione dei residui amminoacidici specifici

della muteina di IL-2 e della proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 con un agente derivatizzante organico che è in grado di reagire con catene laterali selezionate o con residui N-terminali o C-terminali.

[0055] Residui di cisteinile sono più comunemente fatti reagire con α -aloacetati (e ammine corrispondenti), come acido cloroacetico o cloroacetammide, per dare derivati di carbossimetile o carbossiammidometile. Residui di cisteinile sono anche derivatizzati per reazione con bromotrifluoroacetone, acidi α -bromo- β -(5-imidozoi)propionico, cloroacetil fosfato, N-alchilmaleimmidi, 3-nitro-2-piridil disolfuro, metil 2-piridil disolfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenolo, o cloro-7-nitrobenzo-2-ossa-1,3-diazolo.

[0056] Residui di istidile sono derivatizzati per reazione con dietilpirocarbonato a un pH 5,5-7,0 poiché questo agente è relativamente specifico per la catena laterale di istidile. È utile anche para-bromofenacil bromuro; la reazione è preferibilmente eseguita in 0,1M di sodio cacodilato a pH 6,0.

[0057] Residui ammino-terminali e di lisinile sono fatti reagire con anidride acida succinica o altro acido carbossilico. La derivatizzazione con questi agenti ha l'effetto di invertire la carica dei residui di lisinile. Altri reagenti idonei per la derivatizzazione di residui contenenti alfa-ammino includono immidoesteri come metil picolinimmidato; piridossal fosfato; piridossale; cloroboroidruro; acido trinitrobenzenesolfonico; O-metil-isourea; 2,4-pentandione; e reazione catalizzata da transaminasi con gliossilato.

[0058] Residui di arginile sono modificati per reazione con uno o svariati reagenti convenzionali, tra cui fenilgliossale, 2,3-butandione, 1,2-cicloesandione, e ninidrina. La derivatizzazione di residui di arginina richiede che la reazione sia eseguita in condizioni alcaline per via della pK_a elevata del gruppo funzionale guanidina. Inoltre, questi reagenti possono reagire con i gruppi di lisina nonché il gruppo epsilon-ammino di arginina.

[0059] La modifica specifica di residui di tirosile può essere eseguita, con interesse particolare per l'introduzione di etichette spettrali nei residui di tirosile per reazione con composti di diazonio aromatico o tetranitrometano. Più comunemente, N-acetilimidizolo e tetranitrometano sono usati per formare specie O-acetil tirosile e derivati 3-nitro, rispettivamente. Residui di tirosile sono iodurati usando ^{125}I o ^{131}I per preparare proteine marcate per uso in saggi radioimmunologici, il metodo T della clorammina descritto sopra essendo idoneo.

[0060] Gruppi laterali carbossilici (aspartile o glutammile) sono selettivamente modificati per reazione con carbodiimmidi ($R-N=C=N-R'$), in cui R e R' sono gruppi alchile differenti, come 1-cicloesil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimmide o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimmide. Inoltre, residui di aspartile e glutammile sono convertiti in residui di asparaginile e glutaminile per reazione con ioni di ammonio.

[0061] La derivatizzazione con agenti bifunzionali è utile per collegare proteine di legame all'antigene in modo crociato a una matrice o superficie di supporto insolubile in acqua per uso in una varietà di

metodi. Agenti per collegamento crociato comunemente usati includono, ad esempio, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeide, esteri di N-idrossisuccinimide, per esempio, esteri con acido 4-azidosaliciico, immidoesteri omobifunzionali, tra cui disuccinimidil esteri come 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), e maleimmidi bifunzionali come bis-N-maleimmido-1,8-ottano. Agenti derivatizzanti come metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimide producono intermedi fotoattivabili che sono in grado di formare collegamenti crociati in presenza di luce. In alternativa, matrici reattive insolubili in acqua come carboidrati attivati da bromuro di cianogeno e i substrati reattivi descritti nei brev. US nn. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; e 4,330,440 sono impiegati per l'immobilizzazione di proteine.

[0062] Residui di glutaminile e asparaginile sono frequentemente deamidati rispettivamente nei corrispondenti residui glutammile e aspartile. In alternativa questi resi sono deamidati in condizioni lievemente acide. Entrambe le forme di questi residui rientrano nella portata di questa invenzione.

[0063] Altre modifiche includono idrossilazione di prolina e lisina, fosforilazione di gruppi idrossile di residui di serile o treonile, metilazione dei gruppi α -amminici delle catene laterali di lisina, arginina, e istidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pagg. 79-86), acetilazione dell'ammina N-terminale e ammidazione o di qualsiasi gruppo carbossile C-terminale.

[0064] Un altro tipo di modifica covalente della muteina di IL-2 o della proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 che rientra nella portata di questa invenzione può comprendere l'alterazione del profilo di glicosilazione della proteina. Come è noto nell'arte, i profili di glicosilazione possono dipendere sia dalla sequenza della proteina (ad esempio la presenza o l'assenza di particolari residui amminoacidici di glicosilazione, discussi di seguito) o dalla cellula ospite o organismo nel quale viene prodotta la proteina. Di seguito sono discussi particolari sistemi di espressione.

[0065] La glicosilazione di anticorpi o polipeptidi è tipicamente collegata a N o collegata a O. Collegata a N si riferisce all'attacco del gruppo funzionale carboidrato alla catena laterale di un residuo di asparagina. Le sequenze tripeptidiche asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, in cui X è qualsiasi amminoacido eccetto prolina, sono le sequenze di riconoscimento per l'attacco enzimatico della frazione di carboidrato alla catena laterale di asparagina. Pertanto, la presenza di una di queste sequenze tripeptidiche in un polipeptide crea un potenziale sito di glicosilazione. La glicosilazione collegata a O si riferisce all'attacco di uno degli zuccheri N-acetilgalattosammina, galattosio o xilosio all'acido idrossiamminico, più comunemente serina o treonina, sebbene sia altresì possibile usare 5-idrossiprolina o 5-idrossixilisina.

[0066] L'aggiunta di siti di glicosilazione alla muteina di IL-2 o proteina di fusione muteina di IL-2-Fc può essere opportunamente

ottenuta alterando la sequenza amminoacidica in modo tale da contenere una o più delle sequenze tripeptidiche descritte sopra (per i siti di glicosilazione collegati a N). L'alterazione può essere altresì realizzata mediante l'aggiunta di, o la sostituzione da parte di, uno o più residui di treonina alla sequenza di partenza (per siti di glicosilazione collegati a O). Per semplicità, la sequenza amminoacidica della muteina di IL-2 o della proteina di fusione muteina di IL-2-Fc può essere preferibilmente alterata attraverso cambiamenti a livello del DNA, in particolar modo mutando il DNA codificante per il polipeptide bersaglio in corrispondenza di basi preselezionate in modo tale da generare codoni che si tradurranno negli amminoacidi desiderati.

[0067] Un altro mezzo per aumentare il numero di frazioni di carboidrato sulla muteina di IL-2 o della proteina di fusione muteina di IL-2-Fc è mediante accoppiamento chimico o enzimatico di glicosidi alla proteina. Queste procedure sono vantaggiose per il fatto che non richiedono la produzione della proteina in una cellula ospite che ha capacità di glicosilazione per la glicosilazione collegata a N o collegata a O. In base alla modalità di accoppiamento usata, lo/gli zucchero/i può/possono essere attaccato/i a (a) arginina e istidina, (b) gruppi carbossile liberi, (c) gruppi solfidrilici liberi come quelli di cisteina, (d) gruppi idrossile liberi come quelli di serina, treonina o idrossiprolina, (e) residui aromatici come quelli di fenilalanina, tirosina, o triptofano, o (f) il gruppo ammidico di glutammina. Questi metodi sono descritti in WO 87/05330 pubblicato l'11 settembre 1987, e in Aplin e Wriston, 1981,

CRC Crit. Rev. Biochem., pagg. 259-306.

[0068] La rimozione di porzioni funzionali di carboidrato presenti sulla muteina di IL-2 o della proteina di fusione muteina di IL-2-Fc di partenza può essere ottenuta chimicamente o enzimaticamente. La deglicosilazione chimica necessita dell'esposizione della proteina al composto acido trifluorometansolfonico o un composto equivalente. Questo trattamento ha come risultato il clivaggio della maggior parte o di tutti gli zuccheri ad eccezione dello zucchero di collegamento (N-acetilglucosammina o N-acetilgalattosammina), lasciando al contempo il polipeptide intatto. La deglicosilazione chimica è descritta da Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 e by Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Il clivaggio enzimatico di frazioni di carboidrato su polipeptide può essere ottenuto mediante l'uso di una varietà di endo- ed eso-glicosidasi come descritto da Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glicosilazione in corrispondenza di potenziali siti di glicosilazione può essere prevenuta mediante l'uso del composto tunicamicina come descritto da Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina blocca la formazione di collegamenti proteina-N-glicoside.

[0069] Un altro tipo di modifica covalente della muteina di IL-2 o della proteina di fusione muteina di IL-2-Fc comprende collegare la muteina di IL-2 o della proteina di fusione muteina di IL-2-Fc a vari polimeri non proteici inclusi, ma senza limitazione, vari polioli come glicole polietilenico, glicole polipropilenco o poliossialchileni, nella

modalità esposta nei brev. US nn. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337. In aggiunta, possono essere realizzate sostituzioni amminoacidiche in varie posizioni all'interno della muteina di IL-2 o della proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 per facilitare l'aggiunta di polimeri come PEG, producendo muteine di IL-2 e proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2 non PEGilate. Tali proteine PEGilate possono avere emivita aumentata e/o immunogenicità ridotta rispetto alle proteine non PEGilate.

Polinucleotidi codificanti muteine di IL-2 e proteine di fusione di Fc-muteine di IL-2

[0070] Sono qui divulgati acidi nucleici codificanti proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2. Aspetti dell'invenzione includono varianti polinucleotidiche (ad esempio a causa della degenerazione) che codificano le sequenze amminoacidiche qui descritte. In aspetti preferiti, il polipeptide codificato dall'acido nucleico isolato è un componente di una proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2.

[0071] Le sequenze nucleotidiche corrispondenti alle sequenze amminoacidiche qui descritte, da usare come sonde o primer per l'isolamento di acidi nucleici o come sequenze query per ricerche su banche dati, possono essere ottenute mediante "retro-traduzione" dalle sequenze amminoacidiche. La ben nota procedura di reazione a catena della polimerasi (PCR) può essere impiegata per isolare e amplificare una sequenza di DNA codificante muteine di IL-2 e proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2. Oligonucleotidi che definiscono le estremità

desiderate della combinazione di frammenti di DNA sono impiegati come primer al 5' e al 3'. Gli oligonucleotidi possono contenere in aggiunta siti di riconoscimento per endonucleasi di restrizione, per facilitare l'inserzione della combinazione amplificata di frammenti di DNA in un vettore di espressione. Le tecniche di PCR sono descritte in Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., a cura di, Academic Press, Inc., San Diego (1989), pagg. 189-196; e *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., a cura di, Academic Press, Inc. (1990).

[0072] Le molecole di acido nucleico dell'invenzione possono includere DNA e RNA in forma sia a singolo filamento, sia a doppio filamento, nonché le sequenze complementari corrispondenti. Un "acido nucleico isolato" è un acido nucleico che è stato separato dalle sequenze adiacenti presenti nel genoma dell'organismo da cui l'acido nucleico è stato inizialmente isolato, nel caso di acidi nucleici isolati da fonti presenti in natura. Nel caso di acidi nucleici sintetizzati per via enzimatica da uno stampo o chimicamente, come prodotti di PCR, molecole di cDNA o oligonucleotidi per esempio, resta inteso che gli acidi nucleici risultanti da tali processi sono acidi nucleici isolati. Una molecola di acido nucleico isolato si riferisce a una molecola di acido nucleico sotto forma di un frammento separato o come componente di un costrutto di acido nucleico più grande. Gli acidi nucleici possono essere sostanzialmente privi di materiale endogeno contaminante. La molecola di acido nucleico è stata derivata preferibilmente da DNA o RNA isolato almeno una volta in forma

sostanzialmente pura e in una quantità o concentrazione che permette l'identificazione, manipolazione e recupero delle sue sequenze nucleotidiche componenti mediante metodi biochimici standard (come quelli delineati in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Tali sequenze sono fornite e/o costruite preferibilmente sotto forma di una cornice di lettura aperta non interrotta da sequenze interne non tradotte, o introni, che sono tipicamente presenti in geni eucariotici. Sequenze di DNA non tradotte possono essere presenti da 5' o 3' da una cornice di lettura aperta, dove le stesse non interferiscono con la manipolazione o espressione della regione codificante.

[0073] Le varianti secondo l'invenzione sono preparate abitualmente mediante mutagenesi sito-specifica di nucleotidi nel DNA codificante la proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2, usando mutagenesi con cassetta o PCR o altre tecniche ben note nell'arte, per produrre DNA codificante la variante, e quindi esprimendo il DNA ricombinante in coltura come qui delineato. Tuttavia, la fusione di Fc-muteina di IL-2 può essere preparata mediante sintesi *in vitro* usando tecniche consolidate. Le varianti presentano tipicamente la stessa attività biologica qualitativa dell'analogo presente in natura, ad esempio espansione di Treg, sebbene possano essere selezionate anche varianti che hanno caratteristiche modificate, come sarà delineato più dettagliatamente di seguito.

[0074] Come sarà apprezzato dai tecnici del ramo, a causa della

degenerazione del codice genetico, può essere prodotto un numero estremamente grande di acidi nucleici, i quali codificano tutti le proteine di fusione di FC-muteina di IL-2 della presente invenzione. Pertanto, avendo identificato una particolare sequenza amminoacidica, i tecnici del ramo potrebbero produrre una serie di acidi nucleici diversi, modificando semplicemente la sequenza di uno o più codoni in modo da non cambiare la sequenza amminoacidica della proteina codificata.

[0075] La presente divulgazione fornisce anche sistemi e costrutti di espressione sotto forma di plasmidi, vettori di espressione, cassette per trascrizione o espressione che comprendono almeno un polinucleotide come sopra. L'invenzione fornisce vettori di espressione comprendenti l'acido nucleico dell'invenzione. In aggiunta, l'invenzione fornisce cellule ospiti comprendenti tali sistemi o costrutti di espressione.

[0076] Tipicamente, i vettori di espressione usati in qualsiasi delle cellule ospiti possono contenere sequenze per il mantenimento di plasmidi e per il clonaggio e l'espressione di sequenze nucleotidiche esogene. In determinate forme di realizzazione, tali sequenze, collettivamente denominate "sequenze fiancheggianti", includeranno tipicamente una o più delle seguenti sequenze nucleotidiche: un promotore, una o più sequenze enhancer, un'origine di replicazione, una sequenza di terminazione trascrizionale, una sequenza intronica completa contenente un sito di splicing donatore e accettore, una sequenza codificante per una sequenza guida per la secrezione di polipeptidi, un sito legante il ribosoma, una sequenza di poliadenilazione,

una regione polilinker per inserire l'acido nucleico codificante per il polipeptide da esprimere, e un elemento marcatore selettivo. Ciascuna di queste sequenze è discussa di seguito.

[0077] Facoltativamente, il vettore può contenere una sequenza codificante "tag", vale a dire una molecola di oligonucleotide situata in corrispondenza dell'estremità 5' o 3' della sequenza codificante la proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2; la sequenza oligonucleotidica codifica per poliHis (come esaHis (SEQ ID NO:21)), un altro "tag" come FLAG, HA (virus dell'influenza emagglutinina), o *myc*, per cui esistono anticorpi disponibili in commercio. Questo tag viene tipicamente fuso al polipeptide dopo l'espressione del polipeptide, e può fungere da mezzo per la purificazione per affinità o il rilevamento della muteina di IL-2 dalla cellula ospite. La purificazione per affinità può essere ottenuta, per esempio, mediante cromatografia su colonna usando anticorpi contro il tag come una matrice di affinità. Facoltativamente, il tag può essere successivamente rimosso dalle muteine di IL-2 e proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2 mediante vari mezzi come l'uso di determinate peptidasi per il clivaggio.

[0078] Le sequenze fiancheggianti possono essere omologhe (vale a dire della stessa specie e/o ceppo della cellula ospite), eterologhe (vale a dire di una specie diversa dalla specie della cellula ospite o del ceppo), ibride (vale a dire una combinazione di sequenze fiancheggianti di più di una fonte), sintetiche o native. Pertanto, la fonte di una sequenza fiancheggiante può essere qualsiasi organismo procariotica o eucariotica,

qualsiasi organismo vertebrato o invertebrato, o qualsiasi pianta, a condizione che la sequenza fiancheggiante sia funzionale in, e possa essere attivata dall'apparato della cellula ospite.

[0079] Sequenze fiancheggianti utili nei vettori di questa invenzione possono essere ottenute mediante qualsiasi dei numerosi metodi ben noti nell'arte. Tipicamente, le sequenze fiancheggianti utili qui saranno state identificate in precedenza mediante mappatura e/o mediante digestione di endonucleasi di restrizione e possono essere pertanto isolate dalla fonte tissutale corretta usando le endonucleasi di restrizione appropriate. In alcuni casi, la sequenza nucleotidica intera di una sequenza fiancheggiante può essere nota. Qui la sequenza fiancheggiante può essere sintetizzata usando i metodi descritti qui per la sintesi o il clonaggio di acidi nucleici.

[0080] Se è nota tutta o soltanto una porzione della sequenza fiancheggiante, essa può essere ottenuta usando la reazione a catena della polimerasi (PCR) e/o mediante screening di una libreria genomica con una sonda idonea come un frammento oligonucleotidico e/o di sequenza fiancheggiante della stessa o di altra specie. Laddove la sequenza fiancheggiante non è nota, un frammento di DNA contenente una sequenza fiancheggiante può essere isolato da un pezzo di DNA più grande che può contenere, per esempio, una sequenza codificante o persino un altro gene o geni. L'isolamento può essere ottenuto mediante digestione di endonucleasi di restrizione per produrre il frammento di DNA corretto seguito da isolamento usando purificazione su gel di

agarosio, cromatografia su colonna Qiagen® (Chatsworth, CA) o altri metodi noti al tecnico del ramo. La selezione di enzimi idonei per raggiungere questo scopo sarà prontamente evidente a un tecnico di ordinaria esperienza nell'arte.

[0081] Un'origine di replicazione è tipicamente una parte di quei vettori di espressione procarioti acquistati in commercio, e l'origine coadiuva l'amplificazione del vettore in una cellula ospite. Se il vettore di scelta non contiene un'origine del sito di replicazione, è possibile sintetizzare chimicamente lo stesso sulla base di una sequenza nota, e ligare lo stesso nel vettore. Per esempio, l'origine di replicazione del plasmide pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) è idonea per la maggior parte dei batteri gram-negativi, e varie origini virali (per esempio SV40, polioma, adenovirus, virus della stomatite vescicolare (VSV) o papillomavirus come HPV o BPV) sono utili per clonare vettori in cellule di mammifero. In generale, il componente origine di replicazione non è necessario per i vettori di espressione di mammifero (per esempio, l'origine di SV40 è spesso usata soltanto poiché essa contiene altresì il promotore precoce del virus).

[0082] Una sequenza di terminazione di trascrizione è tipicamente situata da 3' all'estremità di una regione codificante per il polipeptide e serve per terminare la trascrizione. Solitamente, una sequenza di terminazione di trascrizione nelle cellule procariote è un frammento ricco di G-C seguito da una sequenza di poli-T. Sebbene la sequenza venga facilmente clonata da una libreria o persino acquistata

in commercio come parte di un vettore, essa può essere altresì prontamente sintetizzata usando metodi per la sintesi di acidi nucleici come quelli descritti qui.

[0083] Un gene marcatore selezionabile codifica per una proteina necessaria per la sopravvivenza e la crescita di una cellula ospite cresciuta in un terreno di coltura selettivo. Geni di marcatori di selezione tipici codificano per proteine che (a) conferiscono resistenza ad antibiotici o altre tossine, ad esempio ampicillina, tetraciclina o kanamicina per cellule ospiti procariotiche; (b) integrano deficienze auxotrofe della cellula; o (c) forniscono nutrienti fondamentali non disponibili da terreni complessi o definiti. Marcatori selezionabili specifici sono il gene di resistenza alla kanamicina, il gene di resistenza all'ampicillina e il gene di resistenza alla tetraciclina. Vantaggiosamente, un gene di resistenza alla neomicina può essere altresì usato per la selezione in cellule ospiti sia procariote sia eucariote.

[0084] Altri geni selezionabili possono essere usati per amplificare il gene che verrà espresso. L'amplificazione è il processo in cui i geni che sono necessari per la produzione di una proteina fondamentale per la crescita o la sopravvivenza cellulare vengono ripetuti in tandem all'interno dei cromosomi di successive generazioni di cellule ricombinanti. Esempi di marcatori selezionabili idonei per cellule di mammifero includono diidrofolato reduttasi (DHFR) e geni di timidina chinasi privi di promotori. Trasformanti di cellule di mammifero sono posti a pressione di selezione in cui soltanto i trasformanti vengono fatti

adattare unicamente per sopravvivere in virtù del gene selezionabile presente nel vettore. La pressione di selezione viene imposta coltivando le cellule trasformate in condizioni nelle quali la concentrazione dell'agente di selezione nel terreno viene aumentata in successione, portando pertanto all'amplificazione sia del gene selezionabile sia del DNA che codifica per un altro gene, come una muteina di IL-2 o proteina di fusione muteina di IL-2-Fc. Ne consegue la sintesi di quantità aumentate di un polipeptide come una muteina di IL-2 o proteina di fusione muteina di IL-2-Fc dal DNA amplificato.

[0085] Un sito legante il ribosoma è solitamente necessario per l'inizio di traduzione dell'mRNA ed è caratterizzato da sequenza di Shine-Dalgarno (procarioti) o una sequenza di Kozak (eucarioti). L'elemento è tipicamente situato da 3' al promotore e da 5' alla sequenza codificante del polipeptide da esprimere. Una o più regioni codificanti possono essere collegate operativamente a un sito di legame per il ribosoma (IRES) permettendo la traduzione di due cornici di lettura aperte da un singolo trascritto di RNA.

[0086] In alcuni casi, come laddove si desidera la glicosilazione in un sistema di espressione di cellule ospiti eucariote, è possibile manipolare le varie pre- o pro-sequenze per migliorare la glicosilazione o la resa. Per esempio, è possibile alterare il sito di clivaggio della peptidasi di un particolare peptide segnale, oppure aggiungere pro-sequenze, che possono altresì incidere sulla glicosilazione. Il prodotto proteico finale può avere, nella posizione -1 (rispetto al primo

amminoacido della proteina matura), uno o più amminoacidi aggiuntivi incidenti all'espressione, che possono non essere stati totalmente rimossi. Per esempio, il prodotto proteico finale può avere uno o più residui amminoacidici trovati nel sito di clivaggio della peptidasi, attaccato alla regione ammino-terminale. In alternativa, l'uso di alcuni siti di clivaggio enzimatici può avere come risultato una forma leggermente troncata del polipeptide desiderato, se l'enzima effettua il taglio in corrispondenza di tale area all'interno del polipeptide maturo.

[0087] Vettori di espressione e clonaggio dell'invenzione conterranno tipicamente un promotore che viene riconosciuto dall'organismo ospite e operativamente collegato alla molecola codificante la muteina di IL-2 o proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2. I promotori sono sequenze non trascritte situate a monte (vale a dire al 5') al codone di inizio di un gene strutturale (generalmente entro da 100 a 1000 bp circa) che controllano la trascrizione del gene strutturale. I promotori sono convenzionalmente raggruppati in una di due classi: promotori inducibili e promotori costitutivi. I promotori inducibili iniziano i livelli aumentati di trascrizione dal DNA sotto il loro controllo in risposta ad alcuni cambiamenti delle condizioni di coltura, come la presenza o l'assenza di un nutriente, o un cambiamento di temperatura. I promotori costitutivi, d'altra parte, trascrivono uniformemente un gene cui essi sono operativamente collegati, vale a dire con poco o nessun controllo sull'espressione genica. È ben noto un gran numero di promotori, riconosciuti da una varietà di potenziali cellule ospiti.

[0088] Nell'arte sono altresì ben noti promotori idonei per l'uso con ospiti di lievito. I potenziatori di lievito vengono vantaggiosamente usati con promotori di lievito. Sono ben noti promotori idonei per l'uso con cellule ospiti di mammifero, e includono, ma non in via limitativa, quelli ottenuti da genomi di virus come polioma virus, virus del vaiolo aviario, adenovirus (come adenovirus 2), papilloma virus bovino, sarcoma virus aviario, citomegalovirus, retrovirus, virus dell'epatite B e il più preferibilmente di Simian Virus 40 (SV40). Altri promotori di mammifero idonei includono promotori di mammifero eterologhi, per esempio, promotori di shock termico e il promotore dell'actina.

[0089] Promotori aggiuntivi che possono essere di interesse includono, ma senza limitazione: il promotore precoce di SV40 (Benoist e Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); il promotore di CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); il promotore contenuto nella ripetizione terminale lunga al 3' del virus Rous sarcoma (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); il promotore di timidina chinasi di herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); promotore e sequenze regolatorie dal gene di metallotionina Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); e promotori procariotici come il promotore della beta-lattamasi (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); o il promotore tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Sono di interesse anche le seguenti regioni di controllo trascrizionale animali, che presentano specificità per tessuti e sono state utilizzate in animali transgenici: la regione di controllo del

gene di elastasi I che è attiva nelle cellule acinose pancreatiche (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); la regione di controllo del gene di insulina che è attiva nelle cellule beta del pancreas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); la regione di controllo dei geni immunoglobulinici che è attiva nelle cellule linfoidi (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); la regione di controllo del virus del tumore mammario murino che è attiva in cellule testicolari, della mammella, linfoidi e in mastociti (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); la regione di controllo del gene dell'albumina che è attiva nel fegato (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276); la regione di controllo del gene dell'alfa-feto-proteina che è attiva nel fegato (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); la regione di controllo del gene di alfa 1-antitripsina che è attiva nel fegato (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); la regione di controllo del gene di beta-globina che è attiva in cellule mieloidi (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); la regione di controllo del gene della proteina basica della mielina che è attiva in oligodendrociti nel cervello (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); la regione di controllo del gene della catena leggera-2 della miosina che è attiva nel muscolo scheletrico (Sani, 1985, Nature 314:283-286); e la regione di controllo del gene dell'ormone di rilascio delle gonadotropine che è attiva nell'ipotalamo (Mason et al., 1986,

Science 234:1372-1378).

[0090] Una sequenza enhancer può essere inserita nel vettore per aumentare la trascrizione negli eucarioti superiori. Gli enhancer sono elementi del DNA che agiscono in cis, solitamente di circa 10-300 bp di lunghezza, che agiscono sul promotore per aumentare la trascrizione. Gli enhancer sono relativamente indipendenti da orientamento e posizione, trovati in corrispondenza delle posizioni sia 5' sia 3' all'unità di trascrizione. Sono note numerose sequenze enhancer disponibili da geni di mammifero (ad esempio, globina, elastasi, albumina, alfa-fetoproteina e insulina). Tipicamente, tuttavia, viene usato un potenziatore da un virus. L'enhancer di SV40, l'enhancer del promotore precoce di citomegalovirus, l'enhancer di polioma e gli enhancer di adenovirus noti nell'arte sono elementi enhancer esemplificativi per l'attivazione di promotori eucarioti. Sebbene un enhancer possa essere posizionato nel vettore in 5' o 3' rispetto a una sequenza codificante, esso è tipicamente posizionato in corrispondenza di un sito 5' dal promotore. Una sequenza codificante per una sequenza segnale appropriata nativa o eterologa (sequenza guida o peptide segnale) può essere incorporata in un vettore di espressione per promuovere la secrezione extracellulare della muteina di IL-2 o della proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2. La scelta del peptide segnale o guida dipende dal tipo di cellule ospiti nelle quali deve essere prodotta la proteina, e una sequenza segnale eterologa può sostituire la sequenza segnale nativa. Esempi di peptidi segnale che sono funzionali in cellule ospiti di mammifero includono i seguenti: la

sequenza segnale per interleuchina-7 (IL-7) descritta nel brev. US n. 4,965,195; la sequenza segnale per il recettore di interleuchina-2 descritta in Cosman et al., 1984, Nature 312:768; il peptide segnale per il recettore di interleuchina-4 descritto nel brevetto EP n. 0367 566; il peptide segnale per il recettore di interleuchina-1 di tipo I descritto nel brev. US n. 4,968,607; il peptide segnale per il recettore di interleuchina-1 di tipo II descritto nel brevetto EP n. 0 460 846.

[0091] Il vettore può contenere uno o più elementi che facilitano l'espressione quando il vettore è integrato nel genoma della cellula ospite. Esempi includono un elemento EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) e una regione di attacco alla matrice (MAR). Le MAR mediano l'organizzazione strutturale della cromatina e possono isolare il vettore integrato dall'effetto della "posizione". Pertanto, le MAR sono particolarmente utili quando si usa il vettore per creare trasfettanti stabili. Una serie di acidi nucleici contenenti MAR sintetici è nota nell'arte, ad esempio, brev. US nn. 6,239,328; 7,326,567; 6,177,612; 6,388,066; 6,245,974; 7,259,010; 6,037,525; 7,422,874; 7,129,062.

[0092] I vettori di espressione dell'invenzione possono essere costruiti da un vettore di partenza come un vettore disponibile in commercio. Tali vettori possono o meno contenere tutte le sequenze fiancheggianti desiderate. Laddove una o più delle sequenze fiancheggianti descritte qui non siano già presenti nel vettore, esse possono essere singolarmente ottenute e ligate all'interno del vettore. I metodi usati per ottenere ciascuna delle sequenze fiancheggianti sono

ben noti a un tecnico del ramo.

[0093] Dopo che il vettore è stato costruito e una molecola di acido nucleico codificante una muteina di IL-2 o proteina di Fc-muteina di IL-2 è stata inserita nel sito corretto del vettore, il vettore completato può essere inserito in una cellula ospite idonea per l'amplificazione e/o l'espressione di polipeptidi. La trasformazione di un vettore di espressione in una cellula ospite selezionata può essere ottenuta mediante metodi ben noti inclusi trasfezione, infezione, co-precipitazione con fosfato di calcio, elettroporazione, microiniezione, lipofezione, trasfezione mediata da DEAE-destrano o altre tecniche note. Il metodo selezionato sarà in parte una funzione del tipo di cellula ospite da usare. Questi metodi e altri metodi idonei sono ben noti al tecnico esperto, e sono esposti, per esempio, in Sambrook *et al.*, 2001, di cui sopra.

[0094] Una cellula ospite, quando coltivata in condizioni appropriate, sintetizza una muteina di IL-2 o proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 che può essere successivamente raccolta dal terreno di coltura (se la cellula ospite secerne la stessa nel terreno) o direttamente dalla cellula ospite che produce la stessa (se non viene secreta). La selezione di una cellula ospite appropriata dipenderà da vari fattori, come livelli di espressione desiderati, modificazioni polipeptidiche che sono desiderabili o necessarie per l'attività (come glicosilazione o fosforilazione) e facilità di piegamento in una molecola biologicamente attiva. La cellula ospite può essere eucariotica o procariotica.

[0095] Linee cellulari di mammifero disponibili come ospiti per

l'espressione sono note nell'arte e includono, ma senza limitazione, linee cellulari immortalizzate disponibili presso la American Type Culture Collection (ATCC) e qualsiasi linea cellulare usata in un sistema di espressione noto nell'arte può essere usata per produrre i polipeptidi ricombinanti dell'invenzione. In generale, cellule ospiti sono trasformate con un vettore di espressione ricombinante che comprende DNA codificante una muteina di IL-2 o fusione di Fc-muteina di IL-2. Tra le cellule ospiti che possono essere incorporate vi sono procarioti, lieviti o cellule eucariotiche superiori. I procarioti includono organismi gram negativi o gram positivi, per esempio *E. coli* o bacilli. Le cellule eucariotiche superiori includono cellule di insetto e linee cellulari consolidate originarie da mammifero. Esempi di linee cellulari di mammifero idonee includono la linea COS-7 da cellule di rene di scimmia (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), cellule L, cellule 293, cellule C127, cellule 3T3 (ATCC CCL 163), cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), o loro derivati come Veggie CHO e linee cellulari correlate che crescono in terreni privi di siero (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), cellule HeLa, linee cellulari BHK (ATCC CRL 10), e la linea cellulare CVI/EBNA derivata dalla linea cellulare di rene di cercopiteco grigioverde CVI (ATCC CCL 70) come descritto da McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, cellule di rene embrionale umano 293, cellule 293 EBNA o MSR 293, cellule epidermiche umane A431, cellule Colo205 umane, altre linee cellulari di primate trasformate, cellule diploidi normali, ceppi di cellule derivati da coltura *in vitro* di tessuto primario,

espianti primari, cellule HL-60, U937, HaK o Jurkat. Facoltativamente, linee cellulari di mammifero come HepG2/3B, KB, NIH 3T3 o S49, per esempio, possono essere usate per l'espressione del polipeptide quando è desiderabile usare il polipeptide in vari saggi di trasduzione del segnale o reporter.

[0096] In alternativa, è possibile produrre il polipeptide in eucarioti inferiori come lievito o in procarioti come batteri. Lieviti adatti includono *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, ceppi di *Kluyveromyces*, *Candida*, o qualsiasi ceppo di lievito in grado di esprimere polipeptidi eterologhi. Ceppi batterici adatti includono *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o qualsiasi ceppo batterico in grado di esprimere polipeptidi eterologhi. Se il polipeptide è prodotto in lievito o batteri, può essere desiderabile modificare il polipeptide ivi prodotto, per esempio mediante fosforilazione o glicosilazione dei siti appropriati, al fine di ottenere il polipeptide funzionale. Tali attacchi covalenti possono essere realizzati usando metodi enzimatici o chimici noti.

[0097] Il polipeptide può essere prodotto anche legando funzionalmente l'acido nucleico isolato dell'invenzione a sequenze di controllo idonee in uno o più vettori di espressione di insetto, e impiegando un sistema di espressione dell'insetto. Materiali e metodi per i sistemi di espressione baculovirus/cellula di insetto sono disponibili in commercio in forma di kit da, ad esempio, Invitrogen, San Diego, California USA (kit MaxBac®), e tali metodi sono ben noti nell'arte, come

descritto in Summers e Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), e Luckow e Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Si potrebbero impiegare anche sistemi di traduzione privi di cellule usando RNA derivati dai costrutti di acido nucleico qui divulgati. Vettori di espressione e di clonaggio appropriati per uso con ospiti cellulari batterici, fungini, di lievito e di mammifero sono descritti da Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Una cellula ospite che comprende un acido nucleico isolato dell'invenzione, preferibilmente collegato operativamente ad almeno una sequenza di controllo dell'espressione è una "cellula ospite ricombinante".

[0098] In determinati aspetti, la descrizione divulga un acido nucleico isolato codificante una muteina di IL-2 umana che stimola preferenzialmente linfociti T regolatori e comprende una sostituzione V91K e una sequenza amminoacidica che è identica almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99%, o il 100% alla sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:1. L'acido nucleico isolato può codificare qualsiasi delle muteine di IL-2 esemplificative qui fornite.

[0099] Sono inclusi anche acidi nucleici isolati codificanti qualsiasi delle proteine di fusione di Fc esemplificative qui descritte. La porzione Fc di un anticorpo e la muteina di IL-2 umana possono essere codificate all'interno di una singola cornice di lettura aperta, facoltativamente con un linker codificato tra la regione Fc e la muteina di

IL-2.

[0100] In un altro aspetto, sono qui forniti vettori di espressione comprendenti gli acidi nucleici codificanti la proteina di fusione di Fc di cui sopra collegati operativamente a un promotore.

[0101] In un altro aspetto, sono qui fornite cellule ospiti comprendenti gli acidi nucleici isolati codificanti le proteine di fusione di Fc. La cellula ospite può essere una cellula procariotica, come *E. coli*, o può essere una cellula eucariotica, come una cellula di mammifero. La cellula ospite può essere una linea cellulare di ovaio di criceto cinese (CHO).

[0102] Sono qui descritti metodi di produzione di una muteina di IL-2 umana. I metodi comprendendo la coltura di una cellula ospite in condizioni in cui viene espresso un promotore collegato operativamente a una muteina di IL-2 umana. Successivamente, la muteina di IL-2 umana è raccolta da detta coltura. La muteina di IL-2 può essere raccolta dal terreno di coltura e/o da lisati delle cellule ospiti.

[0103] In un altro aspetto, sono qui forniti metodi di produzione di una proteina di fusione di Fc. I metodi comprendendo la coltura di una cellula ospite in condizioni in cui viene espresso un promotore collegato operativamente a una proteina di fusione di Fc muteina di IL-2 umana. Successivamente la proteina di fusione di Fc è raccolta da detta coltura. La proteina di fusione di Fc può essere raccolta dal terreno di coltura e/o da lisati delle cellule ospiti.

Composizioni farmaceutiche

[0104] In alcuni aspetti, la divulgazione fornisce una composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente efficace di una muteina di IL-2 insieme a diluenti, trasportatore, solubilizzante, emulsionante, conservante e/o adiuvante farmaceuticamente efficace. La muteina di IL-2 può rientrare nel contesto di una proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2. Le composizioni farmaceutiche della divulgazione includono, ma senza limitazione, composizioni liquide, congelate e liofilizzate.

[0105] Preferibilmente, i materiali della formulazione sono atossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati. Le composizioni farmaceutiche possono comprendere una quantità terapeuticamente efficace di una molecola terapeutica contenente la muteina di IL-2, ad esempio una fusione di Fc-muteina di IL-2.

[0106] La composizione farmaceutica può contenere materiali di formulazione per modificare, mantenere o preservare, per esempio, pH, osmolarità, viscosità, trasparenza, colore, isotonicità, odore, sterilità, stabilità, velocità di dissoluzione o rilascio, assorbimento o penetrazione della composizione. Materiali di formulazione idonei possono includere, ma senza limitazione alcuna, amminoacidi (come glicina, glutammina, asparagina, arginina, prolina o lisina); antimicrobici, antiossidanti (come acido ascorbico, solfito di sodio, o sodio idrogeno solfito); tamponi (come borato, bicarbonato, Tris-HCl, citrati, fosfati o altri acidi organici); agenti di carica (come mannitolo o glicina), agenti chelanti (come acido etilendiamminotetracetico (EDTA)); agenti complessanti (come caffeina,

polivinilpirrolidone, beta-ciclodestrina, o idrossipropil-beta-ciclodestrina); riempitivi, monosaccaridi, disaccaridi, e altri carboidrati (come glucosio, mannosio, o destrine); proteine (come albumina sierica, gelatina, o immunoglobuline); agenti coloranti, aromatizzanti e diluenti; agenti emulsionanti; polimeri idrofili (come polivinilpirrolidone); polipeptidi a basso peso molecolare; controioni formanti sali (come sodio); conservanti (come cloruro di benzalconio, acido benzoico, acido salicilico, timerosale, alcol fenilico, metilparabene, propilparabene, clorexidina, acido sorbico o perossido di idrogeno); solventi (come glicerina, glicole propilenico, o glicole polietilenico); alcoli di zuccheri (come mannitolo sorbitolo); agenti sospendenti, tensioattivi o agenti umettanti (come pluronics; PEG; esteri del sorbitano, polisorbati come polisorbato 20 o polisorbato, triton, trometamina, lecitina, colesterolo o tiloxapolo); agenti che potenziano la stabilità (come saccarosio o sorbitolo); agenti che potenziano la tonicità (come alogenuri di metalli alcalini - preferibilmente cloruro di sodio o potassio - o mannitolo sorbitolo); veicoli di rilascio; diluenti; eccipienti e/o adiuvanti farmaceutici. Si veda, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18^a edizione, (A. R. Genrmo, a cura di), 1990, Mack Publishing Company.

[0107] In determinati aspetti della divulgazione, la composizione farmaceutica ottimale sarà determinata da un tecnico del ramo, ad esempio, in base alla via di somministrazione intesa, alla forma di rilascio e al dosaggio desiderato. Si veda, per esempio, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, sopra. In determinati aspetti, tali

composizioni possono influenzare lo stato fisico, stabilità, velocità di rilascio *in vivo* e velocità di eliminazione *in vivo* delle proteine di legame all'antigene dell'invenzione. In determinati aspetti, il veicolo o trasportatore primario in una composizione farmaceutica può essere di natura acquosa o non acquosa. Per esempio, un veicolo o trasportatore idoneo può essere acqua per soluzioni iniettabili, soluzione salina fisiologica o liquido cerebrospinale artificiale, possibilmente integrato con altri materiali comuni nelle composizioni per la somministrazione parenterale. La soluzione salina tamponata neutra o soluzione salina miscelata con albumina sierica sono ulteriori veicoli esemplificativi. Le composizioni farmaceutiche possono comprendere tampone Tris di pH 7,0-8,5 circa, o tampone acetato di pH 4,0-5,5 circa, e possono inoltre includere sorbitolo o un suo sostituto idoneo. Le composizioni di muteina di IL-2 possono essere preparate per stoccaggio miscelando la composizione selezionata avente il grado di purezza desiderato con agenti di formulazione facoltativi (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, sopra) sotto forma di una torta liofilizzata o una soluzione acquosa. Inoltre, in determinati aspetti della divulgazione, il prodotto muteina di IL-2 può essere formulato come un liofilizzato usando eccipienti appropriati come saccarosio.

[0108] Le composizioni farmaceutiche della divulgazione possono essere selezionate per rilascio parenterale. In alternativa, le composizioni possono essere selezionate per inalazione o per rilascio attraverso il tratto digerente, come per via orale. La preparazione di tali

composizioni farmaceuticamente accettabili rientra nelle competenze dell'arte. I componenti di formulazione sono presenti preferibilmente in concentrazioni che sono accettabili al sito di somministrazione. In determinati aspetti della divulgazione, vengono usati tamponi per mantenere le composizioni a pH fisiologico o a un pH leggermente inferiore, tipicamente all'interno di un intervallo di pH compreso da circa 5 a circa 8.

[0109] Quando viene contemplata la somministrazione parenterale, le composizioni terapeutiche per uso in questa divulgazione possono essere fornite sotto forma di una soluzione acquosa apirogena accettabile per via parenterale comprendente la composizione di muteina di IL-2 desiderata in un veicolo farmaceuticamente accettabile. Un veicolo particolarmente idoneo per l'iniezione parenterale è acqua distillata sterile, nella quale la composizione di muteina di IL-2 viene formulata come soluzione isotonica sterile, conservata in modo corretto. In determinati aspetti, la preparazione può prevedere la formulazione della molecola desiderata con un agente, come microsfere iniettabili, particelle bioerodibili, composti polimerici (come acido polilattico o acido poliglicolico), biglie o liposomi, che possono fornire un rilascio controllato o prolungato del prodotto che può essere rilasciato attraverso iniezione depot. In determinati aspetti, è altresì possibile usare acido ialuronico, avente l'effetto di promuovere la durata prolungata nella circolazione. In determinati aspetti, possono essere usati dispositivi di rilascio di farmaco impiantabili per introdurre la composizione di muteina di IL-2.

[0110] Composizioni farmaceutiche supplementari risulteranno evidenti ai tecnici del ramo, incluse formulazioni che coinvolgono composizioni di muteina di IL-2 in formulazioni a rilascio prolungato o controllato. Ai tecnici del ramo sono altresì note tecniche per formulare una varietà di altri mezzi a rilascio prolungato o controllato, come trasportatori liposomici, microparticelle bioerodibili o biglie porose e iniezioni depot. Si veda, ad esempio, la domanda di brevetto internazionale n. PCT/US93/00829, che descrive il rilascio controllato di microparticelle polimeriche porose per l'erogazione di composizioni farmaceutiche. Le preparazioni a rilascio prolungato possono includere matrici polimeriche semipermeabili sotto forma di articoli formati, ad esempio film o microcapsule. Matrici a rilascio prolungato possono includere poliesteri, idrogel, polilattidi (come divulgato nel brev. US n. 3,773,919 e pubblicazione di domanda di brevetto europeo n. EP 058481), copolimeri di acido L-glutammico e gamma etil-L-glutammato (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), poli (2-idrossietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 e Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), etilene vinil acetato (Langer et al., 1981, sopra) o acido poli-D(-)-3-idrossibutirrico (pubblicazione di domanda di brevetto europeo n EP 133,988). Le composizioni a rilascio prolungato possono altresì includere liposomi che possono essere preparati mediante uno qualsiasi dei numerosi metodi noti nell'arte. Si vedano, ad esempio, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; pubblicazioni di domanda di brevetto europeo nn. EP

036,676; EP 088,046 e EP 143,949.

[0111] Le composizioni farmaceutiche usate per la somministrazione *in vivo* sono tipicamente fornite come preparazioni sterili. La sterilizzazione può essere ottenuta mediante filtrazione attraverso membrane di filtrazione sterili. Quando la composizione viene liofilizzata, la sterilizzazione che usa questo metodo può essere condotta prima o dopo la liofilizzazione e ricostituzione. Le composizioni per la somministrazione parenterale possono essere conservate sotto forma liofilizzata o in una soluzione. Le composizioni parenterali sono generalmente poste in un contenitore avente un'apertura di accesso sterile, per esempio, una sacca o fiala di soluzione endovenosa avente un tappo perforabile mediante un ago per iniezione ipodermica.

[0112] Aspetti dell'invenzione includono formulazioni di muteina di IL-2 auto-tamponanti, che possono essere usate come composizioni farmaceutiche, come descritto nella domanda internazionale di brevetto WO 06138181A2(PCT/US2006/022599).

[0113] Come sopra discusso, determinati aspetti dell'invenzione forniscono composizioni di muteina di IL-2, in particolare proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2 farmaceutiche, che comprendono, oltre alla composizione di muteina di IL-2, uno o più eccipienti come quelli descritti a titolo illustrativo in questa sezione e qui altrove. Gli eccipienti possono essere usati nella divulgazione a proposito di una ampia varietà di scopi, come regolazione delle proprietà fisiche, chimiche o biologiche di formulazioni, come regolazione della viscosità, e o procedimenti

dell'invenzione per migliorare l'efficacia e o per stabilizzare tali formulazioni e procedimenti nei confronti della degradazione e del deterioramento causati da, per esempio, stress che si verificano durante la produzione, l'invio, lo stoccaggio, la preparazione prima dell'uso, la somministrazione e in seguito.

[0114] Una varietà di manuali è a disposizione circa la stabilizzazione di proteine e materiali e metodi di formulazione utili a tale scopo, come Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," in: *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter e Manning, a cura di. *Pharmaceutical Biotechnology.* 13: 61-84 (2002), e Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), in particolare nelle parti pertinenti a eccipienti e procedimenti delle stesse formulazioni proteiche auto-tamponanti secondo la presente divulgazione, specialmente per quanto riguarda prodotti farmaceutici a base di proteine e procedimenti per usi veterinari e/o di medicina umana.

[0115] In accordo con determinati aspetti della divulgazione possono essere usati sali, per esempio, per correggere la forza ionica e/o l'isotonicità di una forza ionica e/o per migliorare la solubilità e/o la stabilità fisica di una proteina o altro componente di una composizione secondo la divulgazione.

[0116] Come è ben noto, ioni possono stabilizzare lo stato nativo

di proteine legando residui carichi sulla superficie della proteina e facendo da scudo a gruppi carichi e polari nella proteina e riducendo la forza delle loro interazioni elettrostatiche, interazioni attrattive e repulsive. Gli ioni possono altresì stabilizzare lo stato denaturato di una proteina mediante legame a, in particolare, i collegamenti peptidici denaturati (--CONH) della proteina. Inoltre, l'interazione ionica con gruppi carichi e polari in una proteina può ridurre le interazioni elettrostatiche intermolecolari e, quindi, impedire o ridurre l'aggregazione e l'insolubilità delle proteine.

[0117] Le specie ioniche differiscono in modo significativo per i loro effetti sulle proteine. È stata sviluppata una serie di catalogazioni categoriche di ioni e dei loro effetti sulle proteine che può essere usata nella formulazione di composizioni farmaceutiche secondo la divulgazione. Un esempio è la serie Hofmeister, che cataloga soluti ionici e non ionici polari per il loro effetto sulla stabilità conformazionale di proteine in soluzione. I soluti stabilizzanti sono detti "cosmotropici". I soluti destabilizzanti sono detti "caotropici". I cosmotropi sono comunemente usati a elevate concentrazioni (ad esempio solfato di ammonio > 1 molare) per far precipitare proteine da una soluzione ("salting-out"). I caotropi sono comunemente usati per denaturare e/o solubilizzare proteine ("salting-in"). L'efficacia relativa di ioni nel "salting-out" e nel "salting-in" definisce la loro posizione nella serie Hofmeister.

[0118] Amminoacidi liberi possono essere usati in formulazioni di muteina di IL-2 secondo vari aspetti della divulgazione come agenti di

carica, stabilizzanti, e antiossidanti, nonché per altri usi standard. Lisina, prolina, serina e alanina possono essere usate per stabilizzare proteine in una formulazione. La glicina è utile nella liofilizzazione per garantire la corretta struttura e proprietà della torta. L'arginina può essere utile per inibire l'aggregazione delle proteine, in formulazioni sia liquide sia liofilizzate. La metionina è utile come antiossidante.

[0119] Polioli includono zuccheri, ad esempio mannitolo, saccarosio e sorbitolo e alcoli poliidrici come, per esempio glicerolo e glicole propilenico, e, a scopo della presente discussione, glicole polietilenico (PEG) e sostanze correlate. I polioli sono cosmotropici. Essi sono agenti stabilizzanti utili in formulazioni sia liquide sia liofilizzate per proteggere proteine da procedimenti di degradazione chimica e fisica. I polioli sono utili anche per correggere la tonicità di formulazioni.

[0120] Tra i polioli utili in aspetti selezionati della divulgazione vi è mannitolo, comunemente usato per garantire stabilità strutturale della torta in formulazioni liofilizzate. Esso garantisce la stabilità strutturale alla torta. Viene usato generalmente con un lioprotettore, ad esempio saccarosio. Sorbitolo e saccarosio sono tra gli agenti preferiti per correggere la tonicità e come stabilizzanti per proteggere da stress di congelamento/Scongelamento durante il trasporto o la preparazione di grandi volumi durante il procedimento di produzione. Zuccheri riducenti (che contengono gruppi chetone e aldeide liberi) come glucosio e lattosio, sono in grado di glicare residui superficiali di lisina e arginina. Quindi non sono generalmente tra i polioli preferiti per uso secondo l'invenzione. In

aggiunta, nemmeno gli zuccheri che formano tali specie reattive, come saccarosio, che viene idrolizzato in fruttosio e glucosio in condizioni acide, e quindi genera glicazione, sono tra i polioli preferiti dell'invenzione a tale proposito. PEG è utile per stabilizzare proteine e come crioprotettore e può essere usato nell'invenzione a tale proposito.

[0121] Le formulazioni di muteina di IL-2 possono comprendere inoltre tensioattivi. Molecole proteiche possono essere soggette ad adsorbimento su superfici e a denaturazione e conseguente aggregazione alle interfacce aria-liquido, solido-liquido e liquido-liquido. Questi effetti sono generalmente inversamente proporzionali alla concentrazione di proteine. Queste interazioni deleterie sono in generale inversamente proporzionali alla concentrazione di proteine e sono tipicamente aggravati dall'agitazione fisica, come quella che si genera durante l'invio e la manipolazione di un prodotto.

[0122] I tensioattivi sono usati abitualmente per prevenire, minimizzare o ridurre l'adsorbimento su superfici. Tensioattivi utili nell'invenzione a tale proposito includono polisorbato 20, polisorbato 80, altri esteri di acidi grassi di sorbitano polietossilati, e polossamero 188.

[0123] I tensioattivi sono comunemente usati anche per controllare la stabilità della conformazione delle proteine. L'uso di tensioattivi a tale proposito è proteina-specifico dato che qualsiasi dato tensioattivo tipicamente stabilizzerà alcune proteine e ne destabilizzerà altre.

[0124] I polisorbati sono soggetti a degradazione ossidativa e

spesso, come forniti, contengono quantità di perossidi sufficienti a causare l'ossidazione delle catene laterali dei residui delle proteine, specialmente metionina. Di conseguenza, i polisorbati dovrebbero essere usati con attenzione, e quando usati, dovrebbero essere impiegati alla loro minima concentrazione efficace. A tale proposito, i polisorbati esemplificano la regola generale per cui gli eccipienti dovrebbero essere usati alle loro minime concentrazioni efficaci.

[0125] Le formulazioni di muteina di IL-2 possono comprendere inoltre uno o più antiossidanti. In una certa misura l'ossidazione deleteria di proteine può essere impedita in formulazioni farmaceutiche mantenendo livelli appropriati di ossigeno ambientale e temperatura ed evitando l'esposizione alla luce. Eccipienti antiossidanti possono essere altresì usati per impedire la degradazione ossidativa di proteine. Tra gli antiossidanti utili a tale proposito vi sono agenti riducenti, scavenger di ossigeno/radicali liberi, e agenti chelanti. Gli antiossidanti per uso nelle formulazioni di proteine terapeutiche secondo l'invenzione sono preferibilmente idrosolubili e mantengono la loro attività durante tutto il periodo di validità di un prodotto. L'EDTA è un antiossidante preferito secondo l'invenzione a tale proposito.

[0126] Gli antiossidanti possono danneggiare le proteine. Per esempio, agenti riducenti come in particolare glutatione possono distruggere i collegamenti disolfuro intramolecolari. Pertanto, gli antiossidanti per uso nella divulgazione sono selezionati per, tra l'altro, eliminare o ridurre in modo sufficiente la possibilità che essi stessi

danneggino le proteine nella formulazione.

[0127] Le formulazioni secondo l'invenzione possono includere ioni metallici che sono cofattori di proteine e che sono necessari per formare complessi di coordinazione di proteine, come zinco necessario per formare alcune sospensioni di insulina. Ioni metallici possono inoltre inibire alcuni procedimenti che degradano le proteine. Tuttavia, gli ioni metallici possono anche catalizzare procedimenti fisici e chimici che degradano proteine.

[0128] Ioni magnesio (10-120 mM) possono essere usati per inibire la isomerizzazione dell'acido aspartico in acido isoaspartico. Ioni Ca^{+2} (fino a 100 mM) possono aumentare la stabilità di deossiribonucleasi umana. Mg^{+2} , Mn^{+2} , e Zn^{+2} , tuttavia, possono destabilizzare la rhDNasi. Analogamente, Ca^{+2} e Sr^{+2} possono stabilizzare il Fattore VIII, esso può essere destabilizzato da Mg^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+2} , e la sua aggregazione può essere aumentata da ioni Al^{+3} .

[0129] Le formulazioni di muteina di IL-2 possono comprendere inoltre uno o più conservanti. I conservanti sono necessari quando si sviluppano formulazioni parenterali multi-dose che prevedono più di una estrazione dallo stesso contenitore. La funzione principale è di inibire la crescita microbica e garantire la sterilità del prodotto durante tutto il periodo di validità e il periodo di impiego. Conservanti comunemente usati includono alcol benzilico, fenolo e m-cresolo. Sebbene i conservanti abbiano una lunga storia di uso con agenti parenterali a piccola molecola,

lo sviluppo di formulazioni di proteine che include conservanti può essere complesso. I conservanti hanno quasi sempre un effetto destabilizzante (aggregazione) sulle proteine e questo è diventato un fattore considerevole nel limitare il loro uso in formulazioni di proteine multi-dose. A oggi, la maggior parte dei farmaci a base di proteine è stata formulata solamente come monouso. Tuttavia, quando sono possibili formulazioni multi-dose, queste presentano il vantaggio aggiuntivo di rendere possibile la comodità d'uso per il paziente e una commerciabilità aumentata. Un buon esempio è quello dell'ormone della crescita umano (hGH) dove lo sviluppo di formulazioni con conservanti ha determinato la commercializzazione di presentazioni come penna da iniezioni multi-uso, più comode. Almeno quattro di tali dispositivi a penna contenenti formulazioni con conservanti di hGH sono attualmente presenti sul mercato. Norditropin (liquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (liquido, Genentech) e Genotropin (liofilizzato, cartuccia a due camere, Pharmacia & Upjohn) contengono fenolo mentre Somatropo (Eli Lilly) è formulato con m-cresolo.

[0130] Diversi aspetti devono essere considerati durante la formulazione e lo sviluppo di forme farmaceutiche con conservanti. La concentrazione conservante efficace nel prodotto farmaceutico deve essere ottimizzata. Questo richiede l'analisi di un dato conservante nella forma farmaceutica a intervalli di concentrazioni che conferiscono efficacia antimicrobica senza compromettere la stabilità della proteina.

[0131] Come ci si potrebbe attendere, lo sviluppo di formulazioni

liquide contenenti conservanti è più complesso rispetto alle formulazioni liofilizzate. I prodotti essiccati mediante congelamento possono essere liofilizzati senza il conservante ed essere ricostituiti con un diluente contenente conservante al momento dell'uso. Questo abbrevia il tempo in cui il conservante è a contatto con la proteina, minimizzando significativamente i rischi di stabilità associati. Con le formulazioni liquide, l'efficacia del conservante e la stabilità si dovrebbero mantenere durante l'intero periodo di validità del prodotto (da circa 18 a 24 mesi). Un punto importante da notare è che l'efficacia del conservante dovrebbe essere dimostrata nella formulazione finale contenente il farmaco attivo e tutti i componenti eccipienti.

[0132] Le formulazioni di muteina di IL-2 saranno progettate in generale per vie e metodi di somministrazione specifici, per dosaggi di somministrazione e frequenze di somministrazione specifici, per trattamenti specifici di malattie specifiche, con intervalli di biodisponibilità e persistenza, tra le altre cose. Le formulazioni pertanto possono essere progettate in accordo con l'invenzione per il rilascio tramite qualsiasi via idonea, incluse, ma senza limitazione, le vie orale, aurale, oftalmica, rettale e vaginale, e mediante vie parenterali, inclusa iniezione endovenosa e intraarteriosa, iniezione intramuscolare e iniezione sottocutanea.

[0133] Una volta formulata la composizione farmaceutica, essa può essere conservata in fiale sterili come soluzione, sospensione, gel, emulsione, solido, cristallo o come polvere disidratata o liofilizzata. Tali

formulazioni possono essere conservate in una forma pronta all'uso o in una forma (per esempio liofilizzata) che viene ricostituita prima della somministrazione. L'invenzione fornisce anche kit per produrre una unità di somministrazione a singola dose. I kit dell'invenzione possono contenere ciascuno sia un primo contenitore avente una proteina essiccata sia un secondo contenitore avente una formulazione acquosa. In determinati aspetti di questa divulgazione, sono forniti kit contenenti siringhe preriempite monocamera e multicamera (per esempio siringhe liquide e liosiringhe).

[0134] La quantità terapeuticamente efficace di una composizione farmaceutica contenente la muteina di IL-2 da impiegare dipenderà, per esempio, dal contesto e dagli scopi terapeutici. Un tecnico del ramo apprezzerà che i livelli di dosaggio appropriati per il trattamento varieranno a seconda, in parte, della molecola rilasciata, per cui viene usata la muteina di IL-2, la via somministrazione e la dimensione (peso corporeo, superficie corporea o dimensione dell'organo) e/o condizione (l'età e la salute generale) del paziente. In determinati aspetti, il medico può titolare il dosaggio e modificare la via di somministrazione per ottenere l'effetto terapeutico ottimale. Un dosaggio tipico può essere compreso da circa 0,1 µg/kg fino a circa 1 mg/kg o più, a seconda dei fattori summenzionati. In aspetti specifici, il dosaggio può essere compreso da 0,5 µg/kg fino a circa 100 µg/kg, facoltativamente da 2,5 µg/kg fino a circa 50 µg/kg.

[0135] Una quantità terapeutica efficace di una muteina di IL-2

determina preferibilmente una diminuzione della severità di sintomi di malattia, un aumento della frequenza o durata di periodo privi di sintomi di malattia o una prevenzione di danno o disabilità dovuto alla condizione patologica.

[0136] Le composizioni farmaceutiche possono essere somministrate usando un dispositivo medico. Esempi di dispositivo medici per somministrare composizioni farmaceutiche sono descritti nei brev. US nn. 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447, 233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; e 5,399,163.

Muteine di IL-2 per uso in metodi di trattamento di disturbi autoimmuni o infiammatori

[0137] Una muteina di IL-2 della divulgazione può essere usata per trattare un disturbo autoimmune o infiammatorio. In aspetti preferiti, viene usata una proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2.

[0138] Disturbi che sono particolarmente gestibili con il trattamento con la muteina di IL-2 qui divulgata includono, ma senza limitazione, infiammazione, malattia autoimmune, malattie atopiche, malattia autoimmuni paraneoplastiche, infiammazione di cartilagini, artrite, artrite reumatoide, artrite giovanile, artrite reumatoide giovanile, artrite reumatoide giovanile pauciarticolare, artrite reumatoide giovanile poliarticolare, artrite reumatoide giovanile a comparsa sistemica, spondilite anchilosante giovanile, artrite enteropatica sistemica, artrite reattiva giovanile, sindrome di Reiter giovanile, sindrome SEA (sindrome

da sieronegatività, entesopatia, artropatia), dermatomiosite giovanile, artrite psoriasica giovanile, sclerodermia giovanile, lupus eritematoso sistemico giovanile, vasculite giovanile, artrite reumatoide pauciarticolare, artrite reumatoide poliarticolare, artrite reumatoide a comparsa sistemica, spondilite anchilosante, artrite enteropatica, artrite reattiva, sindrome di Reiter, sindrome SEA (sindrome da sieronegatività, entesopatia, artropatia), dermatomiosite, artrite psoriasica, sclerodermia, vasculite, miolite, polimiolite, dermatomiolite, poliarterite nodosa, granulomatosi di Wegener, arterite, polimialgia reumatica, sarcoidosi, sclerosi, sclerosi biliare primaria, colangite sclerotizzante, sindrome di Sjogren, psoriasi, psoriasi a placche, psoriasi guttata, psoriasi inversa, psoriasi pustolare, psoriasi eritrodermica, dermatite, dermatite atopica, aterosclerosi, lupus, malattia di Still, lupus eritematoso sistemico (SLE), miastenia gravis, malattia infiammatoria intestinale (IBD), malattia di Crohn, colite ulcerosa, celiachia, sclerosi multipla (MS), asma, BPCO, rinosinusite, rinosinusite con polipi, esofagite eosinofilica, bronchite eosinofilica, malattia di Guillain-Barre, diabete mellito di tipo I, tiroidite (ad esempio malattia di Graves), malattia di Addison, fenomeno di Raynaud, epatite autoimmune, GVHD, rigetto di trapianto, danno renale, vasculite indotta da epatite C, aborto spontaneo e simili.

[0139] In aspetti preferiti, il disturbo autoimmune o infiammatorio è lupus, malattia del trapianto contro l'ospite, vasculite indotta da epatite C, diabete di tipo I, sclerosi multipla, aborto spontaneo, malattie atopiche e malattie infiammatorie intestinali.

Uso in metodi di espansione di linfociti Treg

[0140] La muteina di IL-2 o proteine di fusione Fc-muteina di IL-2 possono essere usate per espandere linfociti Treg all'interno di un soggetto o campione. Sono qui forniti metodi per aumentare il rapporto di linfociti Treg rispetto a linfociti T non regolatori. Il metodo comprende mettere a contatto una popolazione di linfociti T con una quantità efficace di una muteina di IL-2 o di una fusione di Fc-muteina di IL-2 umana. Il rapporto può essere misurato determinando il rapporto di linfociti CD3+FOXP3+ rispetto a linfociti CD3+FOXP3- all'interno della popolazione di linfociti T. La tipica frequenza di Treg nel sangue umano è 5-10% dei linfociti T CD4+CD3+ totali, tuttavia, nelle malattie sopra elencate questa percentuale può essere superiore o inferiore. In aspetti preferiti, la percentuale di Treg aumenta di almeno il 10%, almeno 20%, almeno il 30%, almeno il 40%, almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70%, almeno l'80%, almeno il 90%, almeno il 100%, almeno il 200%, almeno il 300%, almeno il 400%, almeno il 500%, almeno il 600%, almeno il 700%, almeno l'800%, almeno il 900%,o almeno il 1000%. Aumenti massimi in volte di Treg possono variare per malattie particolari; tuttavia, una frequenza massima di Treg che si potrebbe ottenere attraverso trattamento con muteina di IL-2 è 50% o 60% dei linfociti T CD4+CD3+T totali. In determinati aspetti, la muteina di IL-2 o proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 può essere somministrata a un soggetto e il rapporto di linfociti T regolatori (Treg) rispetto ai linfociti T non regolatori all'interno del sangue periferico di un soggetto aumenta.

[0141] Dato che la muteina di IL-2 e le proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2 espandono preferenzialmente i Treg rispetto ad altri tipi di cellule, esse sono utili anche per aumentare il rapporto dei linfociti T regolatori (Treg) rispetto alle cellule natural killer (NK) nel sangue periferico di un soggetto. Il rapporto può essere misurato determinando il rapporto dei linfociti CD3+FOXP3+ rispetto ai linfociti CD16+ e/o CD56+ che sono CD19- e CD3-.

[0142] Si contempla che le muteine di IL-2 o proteine di fusione di Fc-muteina di IL-2 possano avere un effetto terapeutico su una malattia o disturbo all'interno di un paziente senza espandere significativamente il rapporto di Treg rispetto a linfociti T non regolatori o cellule NK all'interno del sangue periferico del paziente. L'effetto terapeutico può essere dovuto alla attività localizzata della muteina di IL-2 e della proteina di fusione di Fc-muteina di IL-2 presso il sito di infiammazione o autoimmunità.

ESEMPI

Esempio 1 -- Riduzione del numero di mutazioni che conferiscono elevata affinità per CD25

[0143] Le muteine di IL-2 con affinità elevata per CD25 e forza segnalatoria ridotta attraverso IL-2R $\beta\gamma$ promuovono preferenzialmente la crescita e la funzionalità dei Treg. Per ridurre la potenziare immunogenicità, è stato ricercato il numero minimo di mutazioni richiesto per ottenere elevata affinità per CD25. La struttura del cristallo di IL-2 in complesso coi suoi tre recettori (codice PDB - 2B5I) mostra che V69A e

Q74P sono localizzate nella struttura a elica che interagisce con CD25. Questo può spiegare perché V69A e Q74P sono state isolate frequentemente in due screening di mutagenesi di IL-2 indipendenti per elevata affinità di legame a CD25 (Rao et al. 2005; Thanos et al. 2006). Questo esempio esplora quali tra le altre mutazioni nella muteina di IL-2 “2-4” identificate nello screening di Tao et al. sono le più importanti per aumentare l'affinità al di sopra di quella osservata con solamente V69A e Q74P. Le seguenti proteine sono state sottoposte a screening mediante citometria a flusso per il legame a CD25 sulla superficie di linfociti T attivati. Tutti i costrutti includevano anche un FLAG C-terminale e tag di poli-His per la purificazione e il rilevamento. Le specifiche mutazioni sono fornite tra parentesi.

HaMut1D(V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:8)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK F YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut2D (N30S,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:9)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINSYKNPKLTRMLTFK F YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut3D (K35R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:10)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPRLTRMLTFK F YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut4D (T37A,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:11)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLARMLTFK F YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut5D (K48E,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:12)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK F YMPKATELKHLQCLEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut6D (E68D,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:13)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEDALNLAAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut7D (N71R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:14)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut8D (K35R,K48E,E68D,N88D,C125A) (SEQ ID NO: 15)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNNGINNYKNPRLTRMLTFKPYMPEKATELKHLQCLEEELKPLEDVLNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0144] HaMut7D legava CD25 con quasi la stessa affinità dell'isolato originale "2-4" (~200 pM), indicando che la mutazione N71R era in grado di aumentare di molto l'affinità al di sopra di quella osservata con solamente V69A, Q74P (HaMut1D, ~2 nM). Gli altri costrutti possedevano affinità simili o leggermente superiori rispetto a HaMut1D, ad eccezione di HaMut8D, la cui affinità era solo di poco superiore a quella di IL-2 WT.

Esempio 2 -- Muteine di IL-2 fuse a domini Fc di IgG1 per emivita migliorata

[0145] Per ridurre la frequenza di somministrazione richiesta per ottenere arricchimento di Treg con una muteina di IL-2, abbiamo valutato varie fusioni tra IL-2 e domini Fc di IgG1. I domini Fc contenevano mutazioni puntiformi per abolire le funzioni effettrici mediate da IgG1, come la lisi delle cellule bersaglio. Le mutazioni della funzione effettrice di Fc utilizzate nei nostri studi erano A327Q, Ala Ala (L234A+L235A) o N297G. Dato che le muteine di IL-2 selettive per Treg presentano parziale riduzione della potenza di IL-2, è stato importante fondere IL-2 a Fc in modo da non influenzare significativamente la segnalazione di IL-2R. Pertanto, le muteine di IL-2 sono state testate per l'attivazione di IL-

2R con e senza fusione a Fc.

[0146] Per determinare se la dimerizzazione di IL-2 mediante fusione a Fc aumentasse la forza della segnalazione di IL-2R a causa di avidità aumentata per IL-2R, una muteina di IL-2 più debole (haD5) (US20110274650) è stata fusa al terminale amminico di Fc, separata da una sequenza linker GGGGS (SEQ ID NO:5). Questa muteina possedeva 3 mutazioni che influenzavano la segnalazione di IL-2R (E15Q, H16N, N88D), 8 mutazioni per conferire elevata affinità per CD25 (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) (Rao et al. 2005), e C125S per impedire l'appaiamento errato e l'aggregazione della cisteina. La fusione a Fc in questo modo abrogava completamente l'attività biologica di haD5, mentre il suo legame a elevata affinità a CD25 sulla superficie cellulare era potenziato, probabilmente a causa della avidità aumentata dalla dimerizzazione.

[0147] Le muteine di IL-2 sono state fuse anche all'N-terminale o C-terminale di un eterodimero di Fc, in modo che solamente una catena del dimero di Fc recasse il dominio di IL-2. L'accoppiamento eterodimerico tra due catene Fc asimmetriche è stato promosso da interazioni elettrostatiche tra lisine introdotte su una catena Fc e acidi aspartici introdotti sull'altra catena Fc. La muteina di IL-2 haD6 è stata fusa all'N-terminale di una catena Fc o all'altro, nel caso in cui una configurazione fosse preferita, producendo due costrutti proteici detti haD6.FcDD e haD6.FcKK. Abbiamo anche fuso la muteina haMut7D al C-terminale dell'eterodimero di Fc con uno o due linker GGGGS (SEQ

ID NO:5) (FcKK(G4S)haMut7D, FcKK(G4S)2haMut7D). La fusione della muteina di IL-2 haD6 all'N-terminale dell'eterodimero di Fc ha prodotto una perdita parziale di attività rispetto a haD6 libero in esperimenti sia con pSTAT5 sia di proliferazione di linfociti T. Al contrario, la fusione di haMut7D al C-terminale dell'eterodimero di Fc con uno o due linker GGGGS (SEQ ID NO:5) non ha alterato la potenza di haMut7D.

[0148] La fusione di una muteina di IL-2 al C-terminale di un omodimero di Fc è stata altresì indagata. PBMC totali sono state attivate in fiasche per coltura tissutale T75 con 300 milioni di cellule per 100 ml con 100 ng/ml di anti-CD3 (OKT3). Il giorno 3 di coltura le cellule sono state lavate 3 volte e nuovamente testate in terreno fresco per 3 giorni. Le cellule sono state quindi stimulate con le varianti di IL-2 a titolazioni di dose 10x variabili da 1pm a 10nM a un volume finale di 50 µl. Il livello di fosforilazione di STAT5 è stato misurato usando un kit BD phosflow buffer. In breve, 1 ml di phosflow buffer BD lisi/fissazione è stato aggiunto per interrompere la stimolazione. Le cellule sono state fissate per 20 min a 37 °C e permeabilizzate con phosflow perm buffer BD 1x BD su ghiaccio prima di essere colorate per CD4, CD25, FOXP3 e pSTAT5.

[0149] Come si può osservare in Fig. 1, la bioattività delle muteine haMut1D e haMut7D non è stata alterata dalla fusione al C-terminale di un omodimero di Fc. Inoltre, la fusione tra l'N-terminale di IL-2 e il C-terminale di Fc non ha compromesso l'attività agonista delle muteine di IL-2, anche nel contesto di un omodimero di Fc-IL-2. In questi costrutti, la mutazione C125A è stata usata al posto di C125S per

produzione migliorata.

Esempio 3 -- Affinamento della potenza della muteina di IL-2 per ottenere crescita preferenziale dei Treg

[0150] Il gruppo iniziale di muteine di IL-2 conteneva solamente N88D con 1 o 2 mutazioni aggiuntive che influenzavano la segnalazione di IL-2R. È stato progettato un secondo gruppo di muteine, tutte con singole mutazioni puntiformi, allo scopo di identificare muteine con agonismo simile o leggermente più potente rispetto a quelle della serie N88D. Un gruppo di 24 mutazioni di segnalazione è stato identificato in base agli amminoacidi predetti come interagenti con IL-2R β (struttura del cristallo, codice PDB - 2B5I). Particolari sostituzioni sono state selezionate in base alla diminuzione predetta dell'energia libero di legame tra la muteina e IL-2R β . L'energia libera di legame è stata calcolata usando l'algoritmo computazionale EGAD (laboratorio di Handel, Università della California di San Diego, USA). L'energia libero di legame di un mutante è identificata come $\Delta\Delta G_{mut} = \mu (\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$. Dove, μ ($=0,1$, in generale) è il fattore di scalabilità usato per normalizzare le variazioni predette dell'affinità di legame per avere una pendenza di 1 quando si confrontano le energie sperimentali (Pokala e Handel 2005). L'energia libera di dissociazione (ΔG) è stata definita come la differenza di energia tra il complesso (ΔG_{legato}) e gli stati liberi (ΔG_{libero}). L'energia di dissociazione ΔG_{mut} è stata calcolata per ciascuna sostituzione.

[0151] Un gruppo di muteine di IL-2 con le seguenti sostituzioni

(H16E, H16Q, L19K, D20R, D20K, D20H, D20Y, M23H, D84K, D84H, S87Y, N88D, N88K, N88I, N88H, N88Y, V91N, V91K, V91H, V91R, I92H, E95K, E95R, o E95I) è stato espresso come fusioni al C-terminale all'eterodimero di Fc. Questi costrutti contenevano anche le mutazioni haMut7 per elevata affinità di legame a CD25 (V69A, N71R, Q74P) e C125A per ripiegamento efficiente.

[0152] Il gruppo è stato sottoposto a screening per potenza nel saggio di fosforilazione di STAT5 di linfociti T dell'Esempio 2, e è stato trovato che H16E, D84K, V91N, V91K, e V91R possiedono attività inferiore a IL-2 selvatica e superiore a N88D (FIG. 2).

[0153] H16E, D84K, V91N, V91K, e V91R possedevano attività inferiore a IL-2 selvatica e superiore a N88D.

[0154] Muteine selezionate sono state testate anche in saggi di crescita di linfociti T e cellule NK.

[0155] Per il saggio sui linfociti T, PBMC totali sono state attivate a 3 milioni/ml con 100 ng di OKT3. Il giorno 2 le cellule sono state lavate 3 volte e nuovamente testate in terreno fresco per 5 giorni. Le cellule sono state quindi marcate con CFSE e ulteriormente coltivate in una piastre da 24 pozzetti a 0,5 milioni/pozzetto in terreno contenente IL-2 per 7 giorni prima dell'analisi FACS. La proliferazione di sottotipo di linfociti T è presentata in Fig. 3 come diluizione di CFSE (fluorescenza mediana di CFSE).

[0156] Per il saggio sulle cellule NK, cellule NK CD16+ separate da MACS sono state coltivate in terreno contenente IL-2 per 3 giorni a

0,1 milioni/pozzetto in piastre da 96 pozzetti. 0,5 μ Ci di 3 H-timidina sono stati aggiunti a ciascun pozzetto durante le ultime 18 ore di incubazione. I risultati sono mostrati nella Fig. 4.

[0157] I mutanti H16E, D84K, V91N, V91K, e V91R sono stati in grado di stimolare la crescita di Treg in modo simile a IL-2 selvatica ma erano potenti circa 10 volte di meno su altri linfociti T (FIG. 3), e circa 100 volte meno potenti sulle cellule NK (FIG. 4).

[0158] Un gruppo separato di proteine di fusione di Fc-IL-2 separate panel è stato progettato in cui la distanza tra l'eterodimero di Fc e la muteina haMut7 (V69A, N71R, Q74P, C125A) era ridotta da una serie di singoli troncamenti di amminoacidi.

```
Fc.haMut7 Fc...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7
(SEQ ID NO:22)

Trunc1 Fc...TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:23)
Trunc2 Fc...TQKSLSLS-STKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:24)
Trunc3 Fc...TQKSLSLS--TKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:25)
Trunc4 Fc...TQKSLSLS---KKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:26)
Trunc5 Fc...TQKSLSLS----KTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:27)
Trunc6 Fc...TQKSLSLS-----TQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:28)
Trunc7 Fc...TQKSLSLS-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:29)
Trunc8 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:30)
```

[0159] Trunc1-Trunc4 possedeva pari potenza al costrutto originario a lunghezza intera Fc.haMut7, misurata mediante fosforilazione di STAT5 e mediante proliferazione di linfociti T e cellule NK come descritto per le Fig. 2, 3 e 4. Trunc5 e Trunc6 stimolavano risposte più deboli, tuttavia più forti di quelle stimolate dalla mutazione

N88D (haD e haMut7D) e molto simili a quelle stimulate da V91K. Trunc7 era più debole delle muteine N88D, e Trunc8 presentava attività molto scarsa. Quando testati sulle cellule NK, tuttavia, Trunc5 e Trunc6 erano agonisti più forti di V91K, indicando che la selettività per i Treg si otteneva più facilmente con mutazioni di segnalazione piuttosto che con ingombro sterico attraverso un dominio di Fc prossimale.

Esempio 4 -- Mutazioni per affinità elevata a CD25 nel contesto di un omodimero di Fc

[0160] Le mutazioni che conferivano elevata affinità di legame a CD25 sono state considerate vantaggiose dato che aumentavano il tropismo per linfociti T con elevata espressione di CD25 e perché promuovevano l'associazione CD25::muteina di IL-2 a lungo termine e la segnalazione prolungata. Tuttavia, ridurre il numero di mutazioni può ridurre il potenziale di immunogenicità. Le muteine N88D o V91K, con e senza le mutazioni haMut1 per affinità elevata V69A e Q74P, sono state espresse come fusioni al C-terminale di un omodimero di Fc e la bioattività è stata messa a confronto. In saggi di stimolazione di pSTAT5, l'omodimerizzazione non ha avuto effetto sulla forza del segnale rispetto alla muteina monomerica. Nemmeno l'inversione delle mutazioni per elevata affinità V69A e Q74P non ha alterato la segnalazione di pSTAT5. In saggi di crescita di linfociti T, le mutazioni per elevata affinità hanno ridotto l'attività su linfociti T CD4 e linfociti T CD8 convenzionali ma non su linfociti T regolatori (Fig. 5). Le mutazioni per elevata affinità non hanno alterano nemmeno le risposte proliferative delle cellule NK (Fig.

6).

[0161] Per determinare se le mutazioni per elevata affinità influenzassero le risposte dei linfociti T *in vivo*, abbiamo trattato topi umanizzati (topi NOD.SCID.II2rg-null ricostituiti con cellule staminali ematopoietiche CD34+) con le proteine di fusione di Fc.IL-2 e abbiamo monitorato l'espansione dei Treg. Topi *NOD.SCID.II2rg-null* (NSG) di sette settimane (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) sono stati irraggiati (180 rad) e ricostituiti con 94.000 cellule staminali ematopoietiche di fegato fetale umano CD34+. A 21 settimane, i topi sono stati distribuiti in 6 gruppi in base a distribuzione uguale di chimerismo percentuale (determinato mediante citometria a flusso di PBL) e sono stati trattati con iniezioni sottocutanee da 1 µg delle proteine di fusione di Fc-muteina indicate o con PBS il giorno 0 e il giorno 7. Il giorno 11, le frequenze dei sottogruppi di linfociti T nel sangue sono state determinate mediante citometria a flusso. Alla dose bassa di 1 µg per animale, le mutazioni per elevata affinità non hanno migliorato l'espansione dei Treg oltre quella osservata con le mutazioni N88D o V91K da sole (Fig. 7).

[0162] L'espansione dei Treg era selettiva poiché i linfociti T FOXP3⁻CD4⁺ non sono aumentati per numero rispetto ai leucociti totali del sangue periferico (PBL), che include una miscela di linfociti B e T umani e cellule mieloidi di topo. Inoltre, a dosi superiori, le mutazioni per elevata affinità hanno promosso un aumento dei linfociti T CD25⁺FOXP3⁻, riducendo pertanto la selettività dei Treg. Pertanto, nel contesto dell'omodimero di Fc, le mutazioni per elevata affinità non sono state

considerate necessarie per promuovere la crescita preferenziale dei Treg.

Fc.WT IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(C125A) (SEQ ID NO:16)

DKTHTCPFCPEPELLGGSPVFLPFPKPKDTLMISRTEFVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREQDYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTLSKAKGQPRFPQVYTLPPSRFPMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVE
WFENGGQFENNYKTTPEVLTQSDGSPFLYSKLTVELKSRWQDGNVFCSCVMHFEALGNHYTQKSTLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEBBLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLEELKGSSETPFCRYADETATIVKFLNRWCTFAQSTLSLIT

Fc.haMutIV91K IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V69A, Q74P, V91K, C125A) (SEQ ID NO:17)

DKTHTCPFCPEPELLGGSPVFLPFPKPKDTLMISRTEFVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREQDYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTLSKAKGQPRFPQVYTLPPSRFPMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVE
WFENGGQFENNYKTTPEVLTQSDGSPFLYSKLTVELKSRWQDGNVFCSCVMHFEALGNHYTQKSTLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEBBLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLEELKGSSETPFCRYADETATIVKFLNRWCTFAQSTLSLIT

Fc.V91K IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V91K, C125A) (SEQ ID NO:18)

DKTHTCPFCPEPELLGGSPVFLPFPKPKDTLMISRTEFVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREQDYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTLSKAKGQPRFPQVYTLPPSRFPMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVE
WFENGGQFENNYKTTPEVLTQSDGSPFLYSKLTVELKSRWQDGNVFCSCVMHFEALGNHYTQKSTLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEBBLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLEELKGSSETPFCRYADETATIVKFLNRWCTFAQSTLSLIT

Fc.haMutIN88D IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:19)

DKTHTCPFCPEPELLGGSPVFLPFPKPKDTLMISRTEFVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREQDYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTLSKAKGQPRFPQVYTLPPSRFPMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVE
WFENGGQFENNYKTTPEVLTQSDGSPFLYSKLTVELKSRWQDGNVFCSCVMHFEALGNHYTQKSTLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEBBLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLEELKGSSETPFCRYADETATIVKFLNRWCTFAQSTLSLIT

Fc.N88D IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(N88D, C125A) (SEQ ID NO:20)

NO:20)

DKTHTCPPECPABELLGGSPVELPPEKPKOTLMISRTEPVTGVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKEREQYGGSTY
RVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTTSKAKGQPRPQVYTLPPSRPEPMKKNQVSLTCLVKGFPYPSDTAVE
WFENGGQPFNNYKTTPEVTLSDSSPEFLYSKLTVEKSRWQDGNVFSOSVMIEATGNHYTQKSTLSTSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKXPKLIRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEBBLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SEIKVIVLEFLKGSSETTFMCFYADETATVVEFLNRWTFFAQSTLSTLT

Esempio 5 -- Associazione prolungata a CD25 sulla superficie cellulare di muteine Fc.IL-2

[0163] Un risultato inatteso dagli studi su topi umanizzati è stato che, malgrado la loro ridotta capacità di segnalazione, le muteine inducevano un arricchimento di Treg più consistente rispetto a Fc.WT IL-2. Un arricchimento di Treg e upregolazione di FOXP3 maggiore rispetto a quello visto con Fc.WT è stato osservato a una dose di 1 µg/topo (figura 7) e a una dose inferiore di 0,5 µg/topo (Fig. 8). Questa aumentata potenza *in vivo* può essere conseguenza del ridotto consumo da parte dei linfociti T, che rende più muteina Fc.IL-2 disponibile per segnalazione prolungata.

[0164] Studi di PK *in vitro* e *in vivo* non sono riusciti, tuttavia, a dimostrare una persistenza significativamente aumentata di Fc.V91K o Fc.N88D rispetto a Fc.WT in surnatanti da colture di linfociti T attivati o da siero di topi trattati. Dato che le fusioni di Fc recavano due domini di muteina di IL-2, abbiamo pensato che un aumentato riciclo endosomiale potesse determinare una associazione alla superficie cellulare prolungata dovuta ad avidità aumentata per CD25. In effetti, abbiamo trovato che Fc.V91K e Fc.N88D persistevano in modo più efficiente

rispetto a Fc.WT sulla superficie di linfociti T precedentemente attivati in seguito a breve esposizione alle proteine di fusione (Fig. 9).

[0165] PBMC primarie sono state pre-stimate per 2 giorni con 100 ng/ml di OKT3. Le cellule sono state raccolte, lavate 4 volte e fatte riposare per una notte nel terreno. Le cellule sono state quindi trattate con 400 pM di Fc.IL-2 per 30 min a 37°C. Dopo il trattamento le cellule sono state raccolte per T0 dopo un lavaggio o lavate per altre 3 volte in 12 ml di terreno riscaldato e coltivate per 4 ore. Per rilevare Fc.IL-2 associato alle cellule, le cellule sono state colorate con IgG -FITC (Jackson Immunoresearch) e anti-CD25-APC anti-uomo.

Esempio 6 -- Ottimizzazione della sequenza delle fusioni

[0166] In studi preclinici nei topi, le nostre Fc.muteine di IL-2 hanno mostrato esposizione differenziale quando concentrazioni sieriche della molecola intatta sono state confrontate a quella di solamente la porzione Fc umana, il che è indicativo di catabolita di Fc umano in circolo. Per ottimizzare la stabilità e la farmacocinetica *in vivo* delle nostre Fc.muteine di IL-2, abbiamo caratterizzato modifiche della sequenza delle fusioni per il loro impatto sulla degradazione proteolitica delle Fc.muteine di IL-2 nella circolazione sistemica e durante il riciclo attraverso il sistema reticolo-endoteliale. I seguenti costrutti sono stati valutati per la degradazione proteolitica *in vitro* e *in vivo*.

(Ala_Ala)_G4S	...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQ...	ha7N88D	(SEQ ID NO:31)
(N297G_delK)_G4S	...TQKSLSLSPG_GGGGSAPTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K	(SEQ ID NO:32)
(N297G_KtoA)_AAPT	...TQKSLSLSPGA_____APTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K	(SEQ ID NO:33)
(N297G_KtoA)_AAPA	...TQKSLSLSPGA_____APASSSTKKTQLQ...	ha1V91K	(SEQ ID NO:34)

[0167] La stabilità è stata misurata mediante saggi immunologici

quantitativi che confrontavano le concentrazioni nel tempo di Fc umana totale con quella della Fc.muteina di IL-2 intatta. La proteolisi delle Fc.muteine di IL-2 è stata verificata mediante analisi di Western blot utilizzando anticorpi anti-IL-2 e anti-Fc umano, seguita da cattura immunologica dei cataboliti e caratterizzazione mediante spettrometria di massa. La caratterizzazione mediante spettrometria di massa dei cataboliti di (Ala_Ala)_G4S da campioni *in vitro* e *in vivo* ha identificato la Lys C-terminale del dominio Fc come sito di clivaggio proteolitico. La delezione o mutazione della lisina C-terminale del dominio Fc ((N297G_delK)_G4S e (N297G_KtoA)_AAPT) ha determinato stabilità prolungata *in vitro* nel sito di topi a 37 °C in confronto a costrutti di Fc con la lisina C-terminale ((Ala_Ala)_G4S). Questa stabilità sierica *in vitro* prolungata si traduceva in una maggiore esposizione nei topi, misurata mediante l'area sotto la curva (AUC) della concentrazione sierica di Fc.muteina di IL-2 rispetto al tempo. La stabilità prolungata di Fc.muteine di IL-2 prive della lisina C-terminale è stata osservata *in vitro* anche in siero di scimmie cinomolgo e umano. La mutazione della Thr-3 di IL-2 in Ala ((N297G_KtoA)_AAPA) ha prodotto una stabilità diminuita *in vitro* a 37 °C (rispetto a (N297G_KtoA)_AAPT) nel siero di topo e in incubazioni separate con catepsina umana ricombinante D e L. Questa stabilità nel siero *in vitro* diminuita si traduceva in esposizione inferiore (AUC) nei topi *in vivo* per (N297G_KtoA)_AAPA rispetto a (N297G_KtoA)_AAPT. La caratterizzazione dei cataboliti di (N297G_KtoA)_AAPA da campioni *in vitro* e *in vivo* mediante spettrometria di massa ha identificato Lys 8 e Lys

9 del dominio di muteina di IL-2 come residui soggetti a protolisi, il che non si è osservato per campioni equivalenti di (N297G_KtoA)_AAPT. La stabilità diminuita a 37°C di (N297G_KtoA)_AAPA rispetto a quella di (N297G_KtoA)_AAPT è stata osservata anche *in vitro* nel siero di scimmie cinomolgo e umano.

[0168] A causa dell'importanza della glicosilazione in questa regione e per migliorare potenzialmente la producibilità della proteina di fusione, le sequenze delle fusioni sono state alterate per promuovere la glicosilazione collegata a N piuttosto che quella collegata in O, nel modo seguente.

Original

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 32)

Altered

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(T3N,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPNSSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 35)

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(T3N,S5T,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPNSTSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 36)

IgG1Fc(N297G_delK)::GGNGT::hulL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGNGTAPASSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 37)

IgG1Fc(N297G_delK)::YGNGT::hulL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGYGNGTAPASSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 38)

“Original” = *Originale*

“Altered” = *Alterata*

Esempio 7 - Determinazione della PK/PD in scimmia cinomolgo

[0169] Le terapie immunostimolanti standard a base di IL-2 richiedono sospensioni del farmaco (senza esposizione) tra cicli di dosaggio per evitare effetti collaterali indesiderati. Al contrario, le terapie

per l'espansione o la stimolazione dei Treg possono richiedere esposizione prolungata con livelli di farmaco elevati (C_{min} sierica) sufficienti per la stimolazione dei Treg ma con esposizioni massime (C_{max} sierica) al di sotto dei livelli di farmaco che portano ad attivazione immunitaria. Questo esempio dimostra strategie di dosaggio di muteine con emivita estesa in scimmie cinomolgo per copertura estesa del bersaglio (C_{min} sierica) mantenendo al contempo esposizioni massime (C_{max} sierica) al di sotto dei livelli di farmaco contemplati come necessari per l'attivazione immunitaria proinfiammatoria.

[0170] Scimmie cinomolgo sono trattate con Fc.V91K (IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A) in quattro gruppi (A-D), con tre gruppi (A-C) trattati per via sottocutanea e un gruppo (D) trattato per via endovenosa. Per ciascun gruppo quattro scimmie cinomolgo maschio biologicamente vergini sono trattate tramite la strategia di dosaggio delineata di seguito. Il dosaggio sottocutaneo di muteine con emivita estesa può permettere un maggiore assorbimento linfatico che determina esposizione massima inferiore (C_{max} sierica) e/o una risposta farmacologica più consistente (espansione dei Treg). La strategia di dosaggio per il gruppo A consiste in tre dosi consecutive da 10 microgrammi per chilogrammo il giorno 0, 2, e 4 per il ciclo 1 e 10 microgrammi per chilogrammo il giorno 14, il che permette una copertura prolungata del bersaglio simile a una dose iniziale più elevata di 50 microgrammi per chilogrammo, mantenendo una esposizione massima inferiore (C_{max} sierica). La strategia di dosaggio per il gruppo B è 50

microgrammi per chilogrammo somministrati il giorno n0 e i 14 per confronto con il gruppo A. La strategia di dosaggio per il gruppo C è 50 microgrammi per chilogrammo somministrati il giorno 0 e 28. Che permette la determinazione del fatto che sia necessaria una completa copertura per sostenere l'arricchimento di Treg o del fatto che una sospensione del farmaco sia di beneficio tra cicli di dosaggio. La strategia di dosaggio per il gruppo D del ramo della somministrazione endovenosa è 50 microgrammi per chilogrammo somministrati il giorno 0, il che permette un confronto delle esposizioni massime (C_{max}) e delle differenze nell'arricchimento di Treg con quella del dosaggio sottocutaneo.

[0171] La farmacocinetica (saggio immunologico quantitativo per molecola intatta e Fc umano totale), anticorpi anti-farmaco, CD25 solubile diffuso, e citochine sieriche (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-5, IL-4, e IL-13) misurati ai seguenti punti temporali per ciascun gruppo di dosaggio specificato:

Gruppo A: pre-dose (primo ciclo; dose 1), 48 (pre-dose primo ciclo; dose 2), 96 (pre-dose primo ciclo; dose 3), 100, 104, 120, 168, 216, 264, 336 (pre-dose secondo ciclo), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840, e 1008 ore.

Gruppo B: pre-dose (primo ciclo), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336 (pre-dose secondo ciclo), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840, e 1008 ore.

Gruppo C: pre-dose (primo ciclo), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, 672 (pre-dose secondo ciclo), 676, 680, 696, 744, 792,

840, 912, 1008, 1080, e 1176 ore.

Gruppo D: pre-dose (primo ciclo), 0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, e 672 ore.

[0172] La farmacodinamica (immuno-fenotipaggio e conta di Treg, linfociti T CD4 e CD8 non regolatori e cellule NK nel sangue periferico) è misurata ai seguenti punti temporali per ciascun gruppo di dosaggio specificato:

Gruppo A: pre-dose (primo ciclo; dose 1), 96 (pre-dose primo ciclo; dose 3), 168, 336 (pre-dose secondo ciclo), 456, e 576 ore.

Gruppo B: pre-dose (primo ciclo), 120, 240, 336 (pre-dose secondo ciclo), 456, e 576 ore.

Gruppo C: pre-dose (primo ciclo), 120, 240, 672 (pre-dose secondo ciclo), 792, e 912 ore.

Gruppo D: pre-dose (primo ciclo), 120 e 240 ore.

[0173] L'ematologia e la chimica clinica sono valutate per tutti gli animali e gruppi di dosaggio pre-dose e 24 ore dopo la dose iniziale per gruppo di dosaggio. Sono valutati i seguenti parametri.

Ematologia:

[0174]

- conta leucocitaria (totale e differenziale assoluto)
- conta eritrocitaria
- emoglobina
- ematocrito
- emoglobina corpuscolare media, volume corpuscolare

medio, concentrazione di emoglobina corpuscolare media (calcolata)

- reticolociti assoluti
- conta delle piastrine
- morfologia dei globuli rossi
- ampiezza della distribuzione dei globuli rossi
- volume medio delle piastrine

Chimica clinica:

[0175]

- fosfatasi alcalina
- bilirubina totale (con bilirubina diretta se la bilirubina totale

supera 1 mg/dL)

- aspartato amminotransferasi
- alanina amminotransferasi
- gamma glutammina transferasi
- azoto ureico
- creatinina
- proteina totale
- albumina
- globulina e rapporto A/G (albumina/globulina) (calcolato)
- glucosio
- colesterolo totale
- trigliceridi
- elettroliti (sodio, potassio, cloruro)
- calcio

- fosforo

Esempio 8 - Fc di IgG1 aglicosilato

[0176] Gli anticorpi IgG presenti in natura possiedono un sito di glicosilazione nel dominio costante 2 della catena pesante (CH2). Per esempio, gli anticorpi IgG1 umani hanno un sito di glicosilazione posizionato nella posizione Asn297 (numerazione EU). A oggi, le strategie per produrre anticorpi aglicosilati prevedono sostituire il residuo di Asn con un amminoacido che somiglia ad Asn in termini di proprietà fisico-chimiche (ad esempio Gln) o con un residuo di Ala che mima la catena laterale di Asn senza i gruppi polari. Questo Esempio dimostra i benefici della sostituzione di Asn con glicina (N297G). Gli Fc N297G sono molecole aglicosilate con proprietà biofisiche e caratteristiche di producibilità migliori (ad esempio recupero durante la purificazione).

[0177] L'analisi di più strutture di cristallo note di frammenti Fc e di anticorpi IgG ha rivelato una considerevole flessibilità conformazionale attorno al segmento ansa glicosilato, in particolare presso la posizione Asn297 che è glicosilata. In molte delle strutture di cristallo note, Asn297 adottava angoli diedrali della catena dorsale positiva adattata. La Gly ha elevata propensione ad adattarsi ad angolo diedrale di catena dorsale positiva a causa della mancanza di atomi della catena laterale. Pertanto, in base a questo motivo conformazionale e strutturale, Gly può essere una sostituzione migliore al posto di Asn rispetto a N297Q o N297A.

[0178] La mutazione di Asn297 co Gly porta a molecole a glicosilate con recupero (o efficienza) nel procedimento di purificazione

e proprietà biofisiche di molto migliorati. Per esempio, la percentuale di recupero (resa finale) dal gruppo di proteine A era 82,6% per la mutazione N297G in confronto a 45,6% per N297Q e 39,6% per N297A. L'analisi su colonna SPHP ha rivelato che la percentuale inferiore del recupero per i mutanti N297Q e N297A era dovuta a un picco di coda, che indica aggregazione ad alto peso molecole e/o specie male ripiegate. Questo risultato è stato riconfermato su una scala maggiore da 2L.

[0179] Nell'industria biofarmaceutica, molecole con potenziale necessità di produzione su ampia scala, ad esempio con potenzialità di essere commercializzate come farmaci, sono sottoposte a valutazione di una serie di attributi per mitigare il rischio che la molecola non sia gestibile per la produzione e purificazione su ampia scala. Nelle valutazioni di producibilità, N297G ha rivelato solidità rispetto alle variazioni del pH. N297G non presentava problemi di aggregazione; mentre N297Q e N297A avevano rispettivamente un aumento del 20% e 10% di aggregazione. Sebbene N297G presentasse migliori attributi di producibilità, essa era simile a N297Q e N297A in tutti i saggi funzionali in cui è stata testata. Per esempio, in saggi di ADCC, N297G era priva di citotossicità analogamente a N297Q e N297A.

Esempio 9 - Fc di IgG1 aglicosilato stabilizzato

[0180] Questo Esempio descrive un metodo per migliorare la stabilità di impalcature basate su anticorpi IgG introducendo legame/i disolfuro ingegnerizzato/i. Gli anticorpi IgG presenti in natura sono molecole stabili. Tuttavia, per alcune applicazioni terapeutiche, può

essere necessario realizzare mutazioni o creare molecole aglicosilate. Per esempio, molecole IgG aglicosilate possono essere usate in indicazioni terapeutiche dove è necessario evitare l'ADCC e il legame ai recettori di Fc gamma. Tuttavia, IgG1 aglicosilata ha una temperatura di fusione molto inferiore (la temperatura di fusione del dominio CH2 diminuisce di circa 10 °C; da 70 °C a 60 °C) rispetto alla IgG1 glicosilata. La temperatura di fusione inferiore osservata influenza negativamente varie proprietà biofisiche della IgG1 aglicosilata. Per esempio, la IgG1 aglicosilata ha livello aumentato di aggregazione a pH basso rispetto alla IgG1 glicosilata.

[0181] Al fine di ingegnerizzare ponti disolfuro, è stato inizialmente usato un metodo basato sulla struttura che prevede il calcolo della distanza tra gli atomo C-alfa per identificare 54 coppie di residui nella regione Fc per mutazione in Cys. Questi 54 siti sono stati ristretti ulteriormente a 4 coppie di residui (V259C-L306C, R292C-V302C, A287C-L306C, e V323C-I332C). I criteri usati includevano (i) posizioni all'interno del dominio CH2, (ii) lontano da anse, svolte e carboidrati, (iii) lontano dai siti di interazione col recettore Fcgamma e FcRn, (iv) accessibilità con solventi (posizione sepolte preferite), ecc.

[0182] Le sostituzioni con cisteina appaiate sono state create nel contesto del Fc N297G aglicosilato. L'analisi di mappatura del peptide non ridotto ha rivelato che 3 dei 4 siti ingegnerizzati formavano ponte disolfuro come atteso e progettato in quel contesto. La mutazione V259C-L306C non formava correttamente ponte disolfuro e portava ad

appaiamento errato con il disolfuro nativo già presente nel dominio CH2. Gli altri tre progetti R292C-V302C, A287C-L306C, e V323C-I332C formavano correttamente ponte disolfuro come predetto e progettato. L'aggiunta del ponte disolfuro alla mutazione N297G ha portato a un miglioramento di circa 15C nella stabilità termica rispetto alla mutazione N297G da sola. Tra le varianti con disolfuro R292C-V302C, A287C-L306C, e V323C-I332C, R292C-V302C e A287C-L306C presentavano buona farmacocinetica quando somministrate a ratti ($t_{1/2}$ di rispettivamente 11 giorni e 9 giorni). Questo va in contrasto con il profilo farmacocinetico che abbiamo osservato in ratti per il ponte disolfuro nel dominio CH2 precedentemente pubblicato L247C-K339C (Gong et al., J. Biol. Chem. 2009 284: 14203-14210), che aveva una $t_{1/2}$ di 5 giorni.

[0183] L'ingegneria di un ponte disolfuro nel dominio CH2 fornisce stabilità della molecola aglicosilata alla pari con molecole IgG1 glicosilate (da 10 a 15°C di miglioramento nella temperatura di fusione, determinato mediante calorimetria a scansione differenziale). I siti ingegnerizzati qui descritti non portano a scrambling dei disolfuri e i disolfuri si formano come atteso in circa il 100% della popolazione. Quel che è più importante, diversamente dal sito di legame pubblicato del ponte disolfuro nel dominio CH2, i ponti disolfuro qui descritti non influenzano la PK nel ratto.

[0184] Il profilo farmacocinetico (PK) di anticorpi aglicosilati stabilizzati è stato determinato in scimmie cinomolgo. Un anticorpo IgG1 avente sostituzioni N297G, A287C, e L306C (Ab2-1) e un anticorpo IgG1

avente sostituzioni N297G, R292C, e V302C (Ab2-2) sono stati iniettati per via sottocutanea 5 mg/kg in scimmie cinomolgo (N=2). I campioni di siero sono stati prelevati alla pre-dose, 0,5, 2, 8, 24, 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, e 1680 ore dopo la dose. I campioni sono stati analizzati per i livelli di anticorpo Ab2-1 e Ab2-2 usando un ELISA a sandwich anti-IgG umana. Per misurare il livello di IgG umana nel siero nei campioni per lo studio di PK è stato usato il seguente metodo: piastra nera con 1/2 (Corning 3694) è stata rivestita con 2 µg/ml di anti-Fc umano, anticorpo 1.35.1 in PBS e quindi incubata per una notte a 4 °C. La piastra è stata quindi lavata e bloccata con I-Block™ (Applied Biosystems) per una notte a 4 °C. Se i campioni richiedevano diluizione, essi erano diluiti in siero di scimmia cinomolgo. Gli standard e i campioni sono stati diluiti quindi 1: 20 in tampone 1X PBS +1M NaCl+0,5% di Tween 20 e 1% di BSA (5% di siero). La piastra è stata lavata e campioni da 50 µl di standard e campioni diluiti sono stati trasferiti in una piastra rivestita con anticorpi 1.35.1 e incubati per 1,5 h a temperatura ambiente. La piastra è stata lavata quindi 50 µl di 100 ng/ml di anticorpo anti-Fc umano 21.1- coniugato a HRP in I-Block™ +5% di BSA sono stati aggiunti e incubati per 1,5 h. la piastra è stata lavata, quindi sono stati aggiunti 50 µl di substrato Pico dopodiché la piastra è stata immediatamente analizzata con un luminometro. I dati di concentrazione nel tempo sono stati analizzati usando metodi non compartimentali con WinNonLin® (Enterprise versione 5.1.1, 2006, Pharsight® Corp. Mountain View, CA).

[0185] Le esposizioni di PK degli anticorpi Ab2-1 e Ab2-2 in scimmie cinomolgo sono state confrontate all'anticorpo IgG1 comprendente solamente la sostituzione N297G e all'anticorpo IgG1 comprendente N297G, L247C, e K339C. Le esposizioni di PK degli anticorpi Ab2-1 e Ab2-2 in scimmie cinomolgo erano entrambe superiori all'anticorpo IgG1 comprendente solamente la sostituzione N297G e all'anticorpo IgG1 comprendente N297G, L247C, e K339C. Inoltre Ab2-2 presentava esposizione ed eliminazione confrontabili con l'anticorpo IgG1 originario.

RIVENDICAZIONI

1. Polipeptide comprendente una regione Fc di un anticorpo IgG1 umano in cui detta regione Fc comprende una mutazione N297G, usando lo schema di numerazione EU, e detta regione Fc di una IgG1 umana ha almeno il 90% di identità con la sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:3 o comprende la sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:4; e inoltre in cui A287 e L306; V259 e L306; R292 e V302; o V323 e 1332, usando lo schema di numerazione EU,

della sequenza amminoacidica presentata in SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 sono sostituiti con cisteina.

2. Anticorpo o proteina di fusione di Fc comprendente una regione Fc di rivendicazione 1.

3. Acido nucleico codificante un polipeptide di rivendicazione 1.

4. Vettore di espressione comprendente l'acido nucleico di rivendicazione 3.

5. Cellula ospite comprendente l'acido nucleico di rivendicazione 3.

6. Cellula ospite comprendente il vettore di espressione di rivendicazione 4 in cui la cellula ospite è una cellula ospite di mammifero.

7. Metodo di produzione di una molecola contenente Fc di IgG1 aglicosilata, detto metodo comprendendo:

a) esprimere un acido nucleico codificante un polipeptide di rivendicazione 1 in una coltura cellulare di mammifero; e

b) raccogliere la molecola contenente Fc di IgG1 aglicosilata da detta coltura.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLA 1/11

Figura 1

“phospho-STAT5” = fosfo-STAT5

TAVOLA 4/11

Figura 3

“CFSE median fluorescence” = Fluorescenza mediana di CFSE

TAVOLA 6/11

Figura 5

“CFSE median fluorescence” = Fluorescenza mediana di CFSE

TAVOLA 8/11

Figura 7A

“FOXP3 expression in FOXP3+ Treg” = Espressione di FOXP3 in Treg

FOXP3+

“% FOXP3+ of CD4+CD3+” = “% FOXP3+ di CD4+CD3+”

TAVOLA 9/11

Figura 7B

“% FOXP3+CD4+CD3+ of total PBL” = % FOXP3+CD4+CD3+ dei PBL totali

“% FP3-CD4+ / live” = % FP3-CD4+ / vive

“% FOXP3-CD4+CD3+ of total PBL” = % FOXP3-CD4+CD3+ dei PBL totali

TAVOLA 10/11

Figura 8

“% FOXP3+ of CD4+CD3+” = “% FOXP3+ di CD4+CD3+”

“FOXP3 expression in FOXP3+ Treg” = Espressione di FOXP3 in Treg

FOXP3+

“(mean fluorescence intensity)” = (intensità media di fluorescenza)

“% FOXP3⁺CD4⁺CD3⁺ of total PBL” = % FOXP3⁺CD4⁺CD3⁺ dei PBL totali

“% FOXP3⁻CD4⁺CD3⁺ of total PBL” = % FOXP3⁻CD4⁺CD3⁺ dei PBL totali

TAVOLA 11/11

Figura 9

“CD3⁺ CD4⁺ gate” = gate CD3⁺ CD4⁺

“Cell surface Fc.IL-2” = Fc.IL-2 su superficie cellulare

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

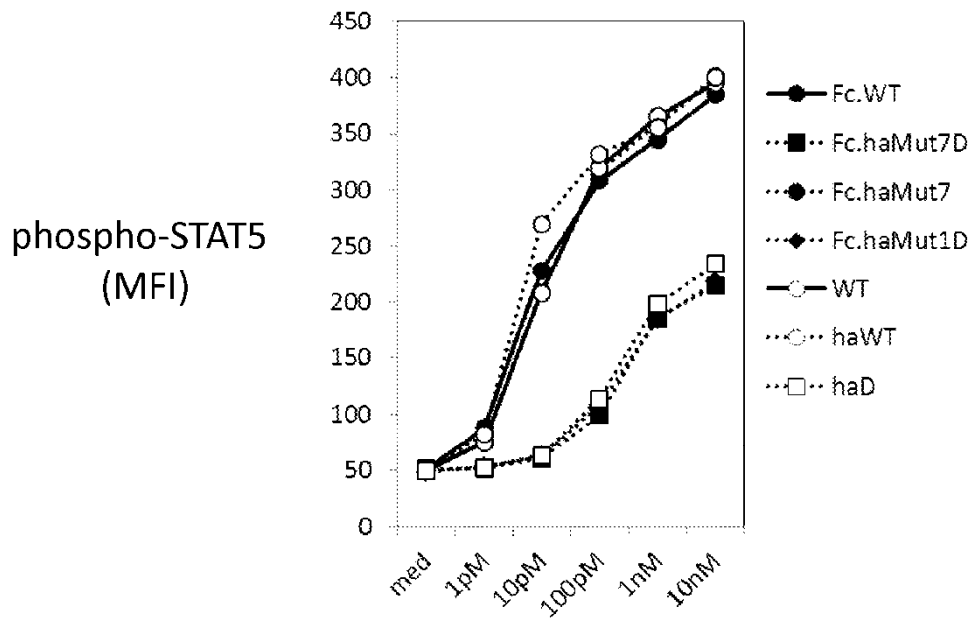


FIG. 1

FIG. 2A

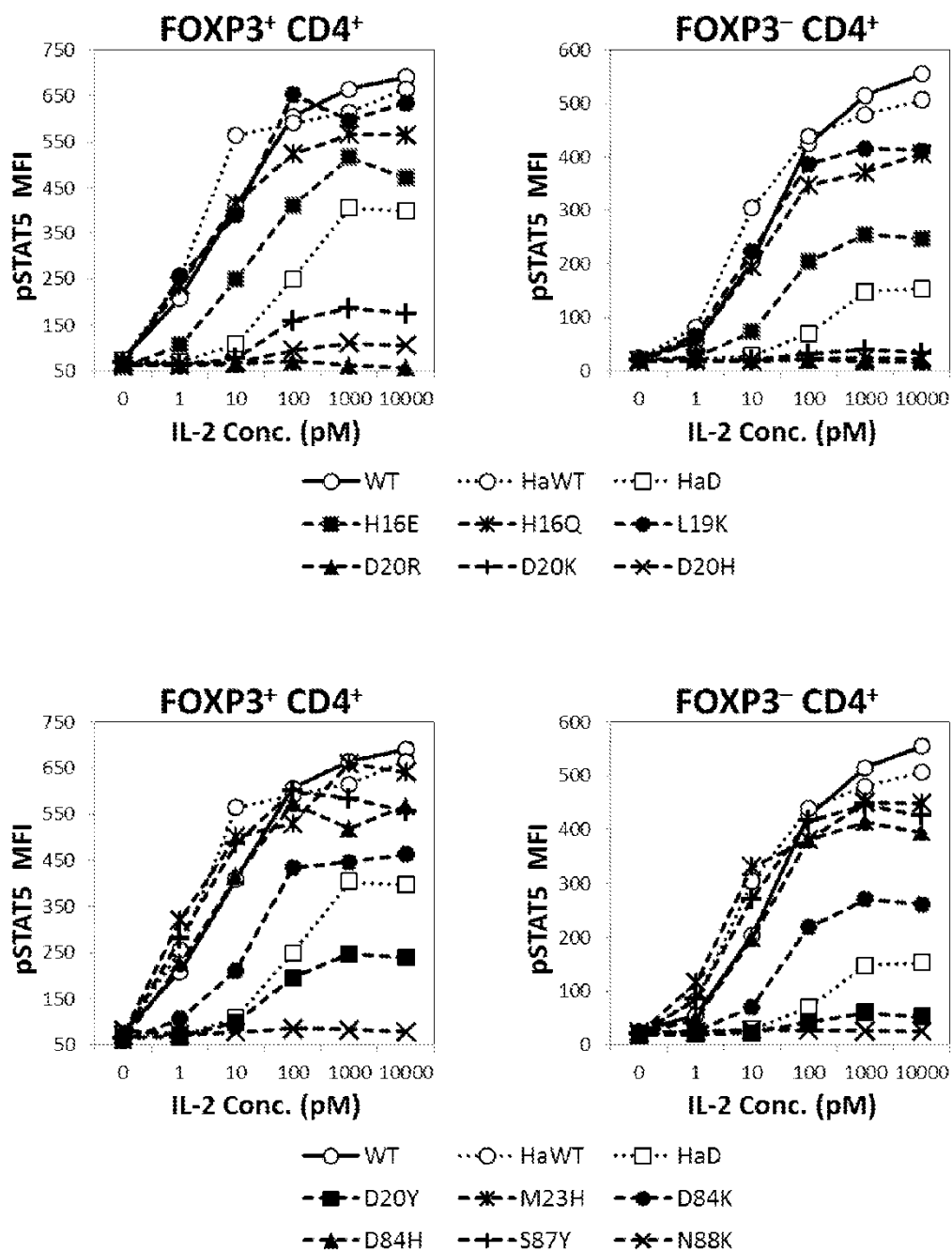
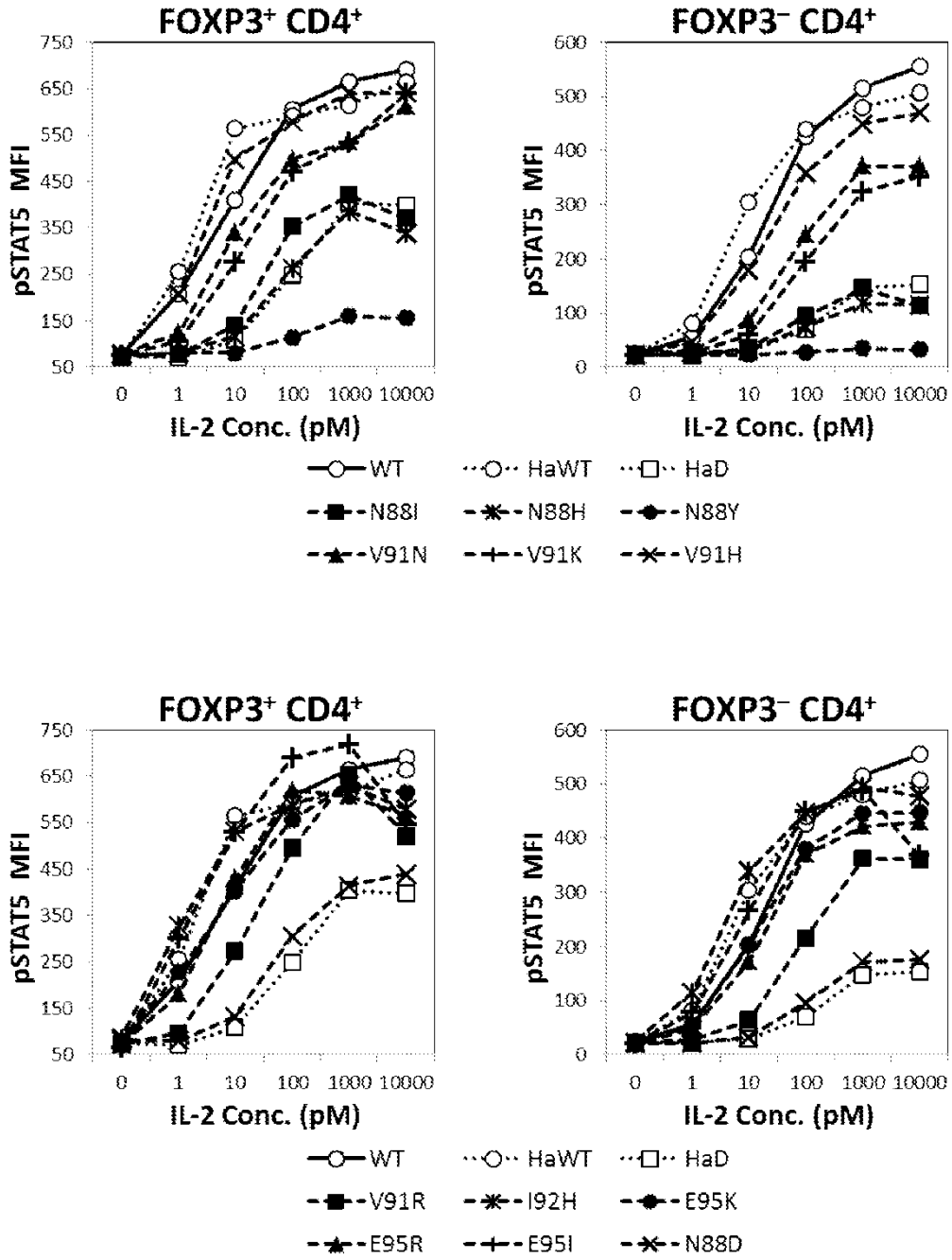


FIG. 2B



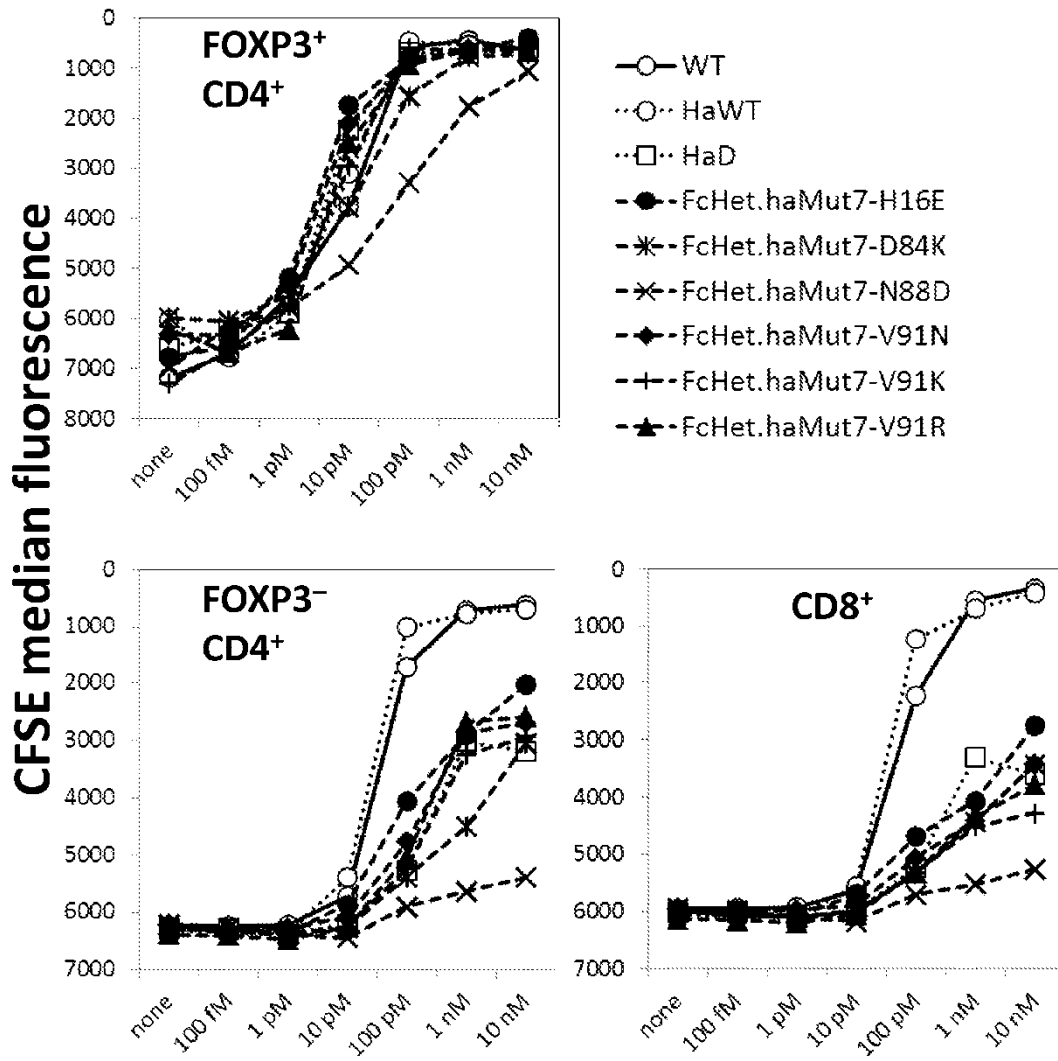


FIG. 3

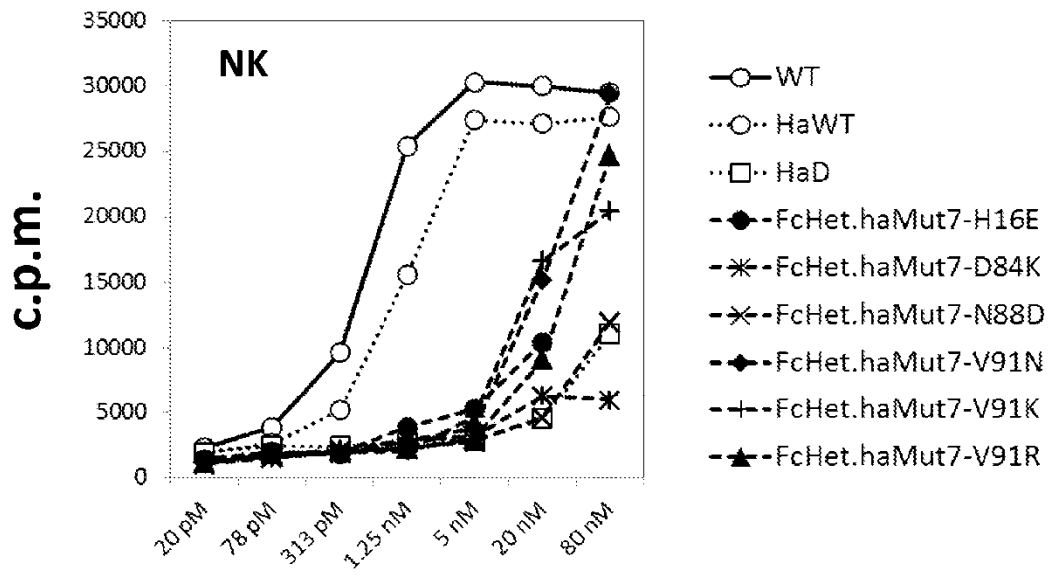


FIG. 4

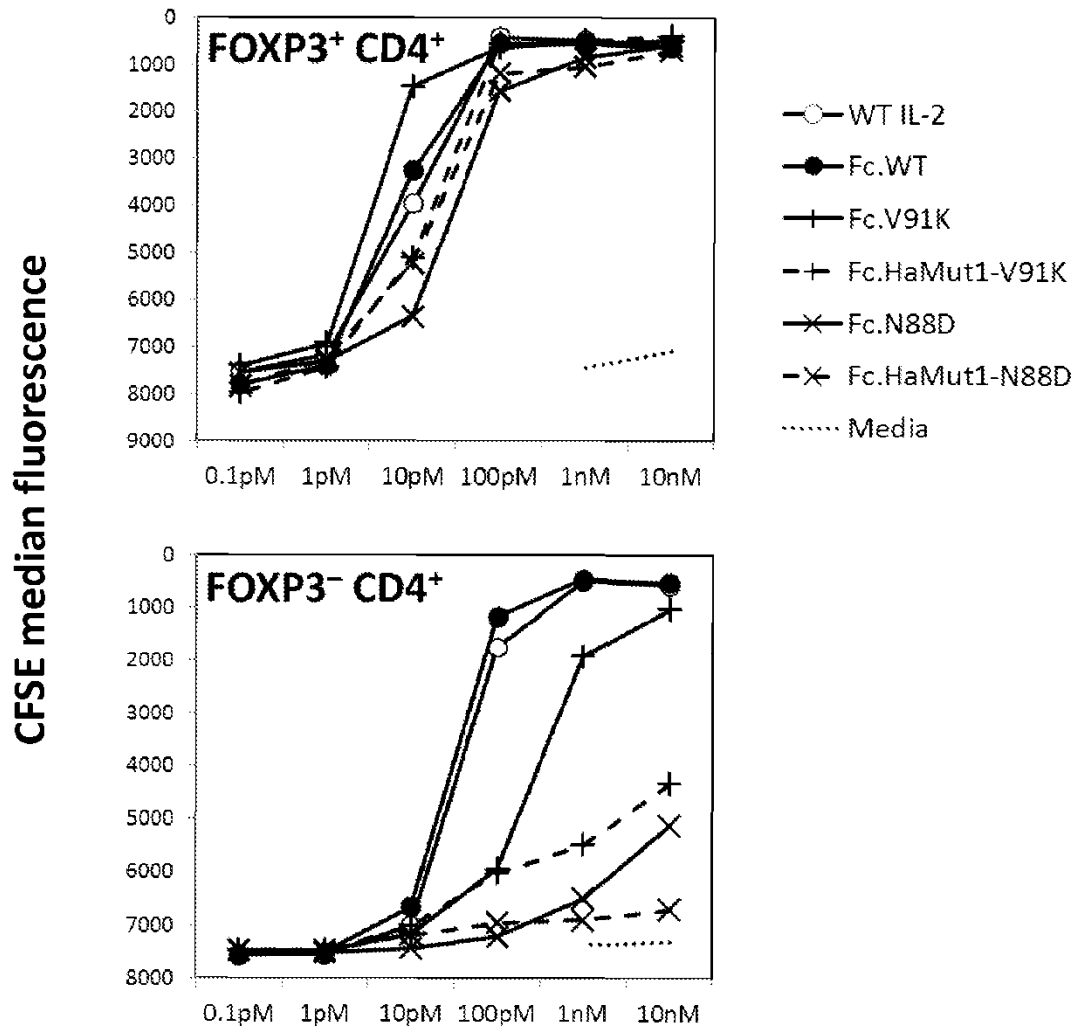


FIG. 5

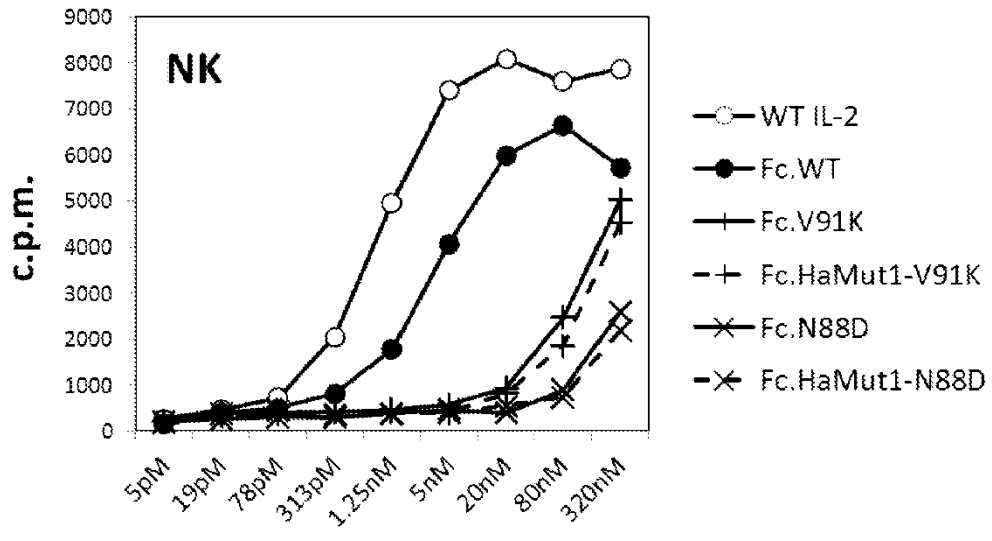


FIG. 6

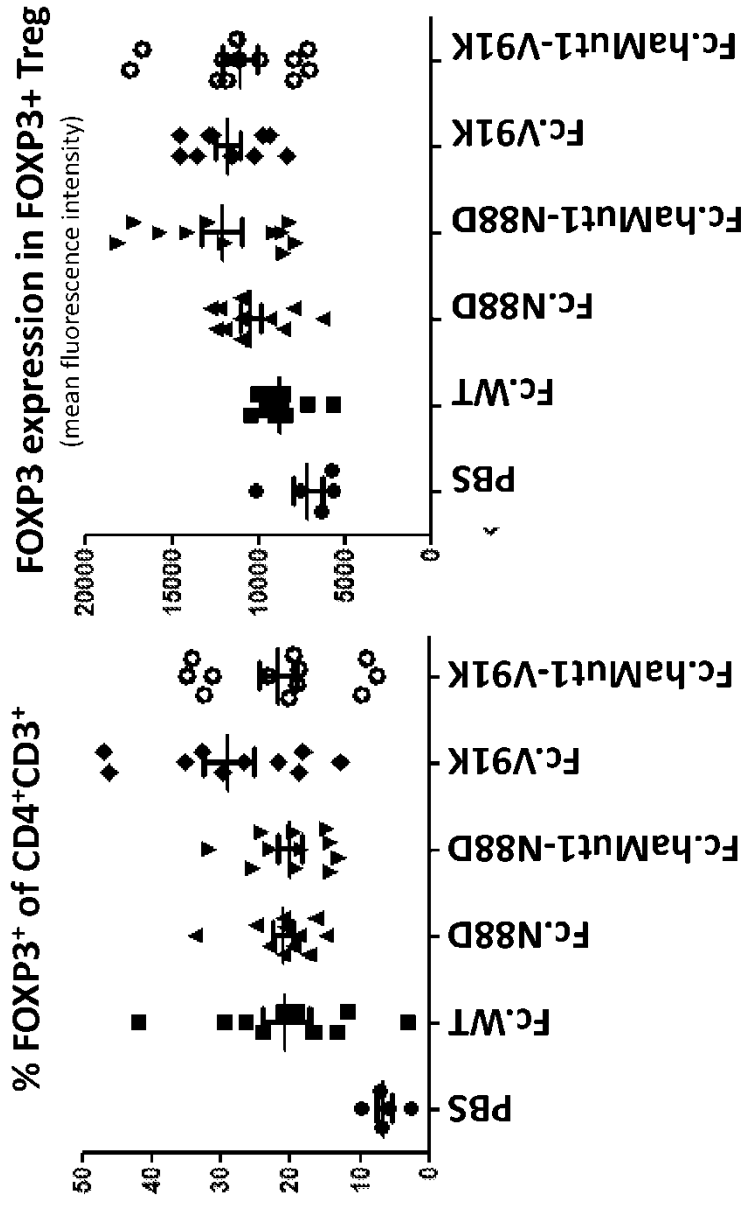


FIG. 7A

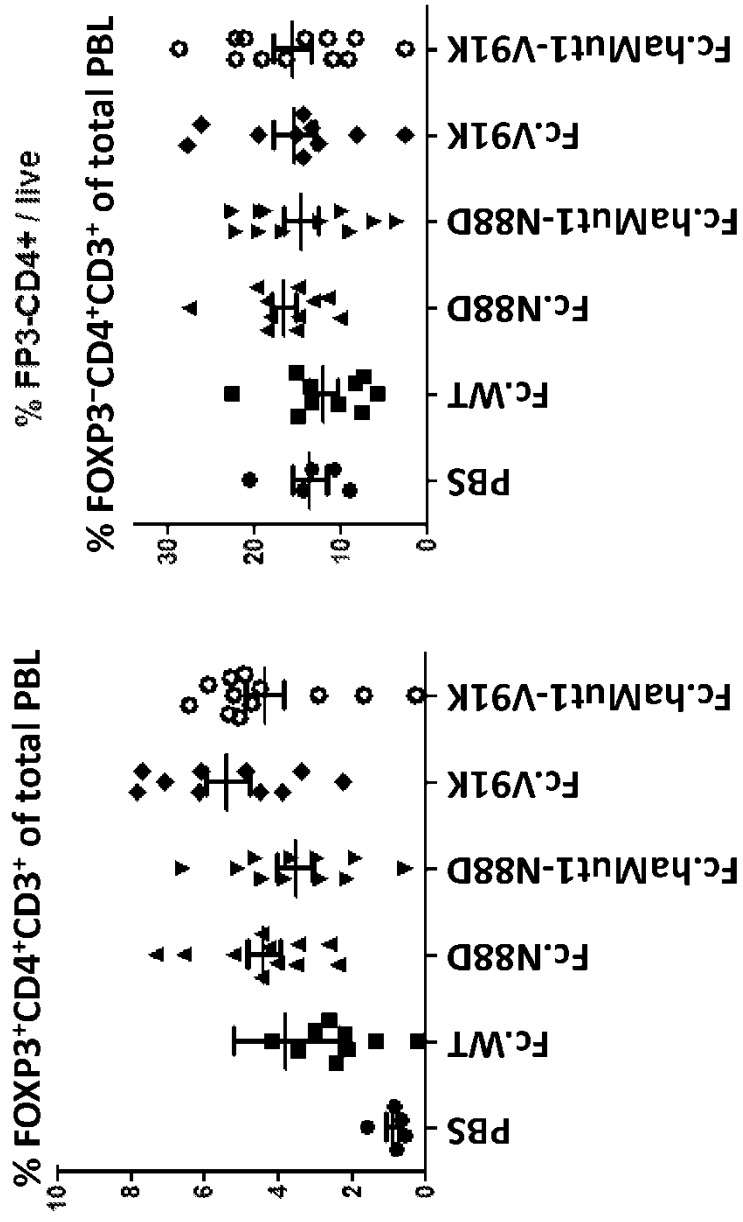
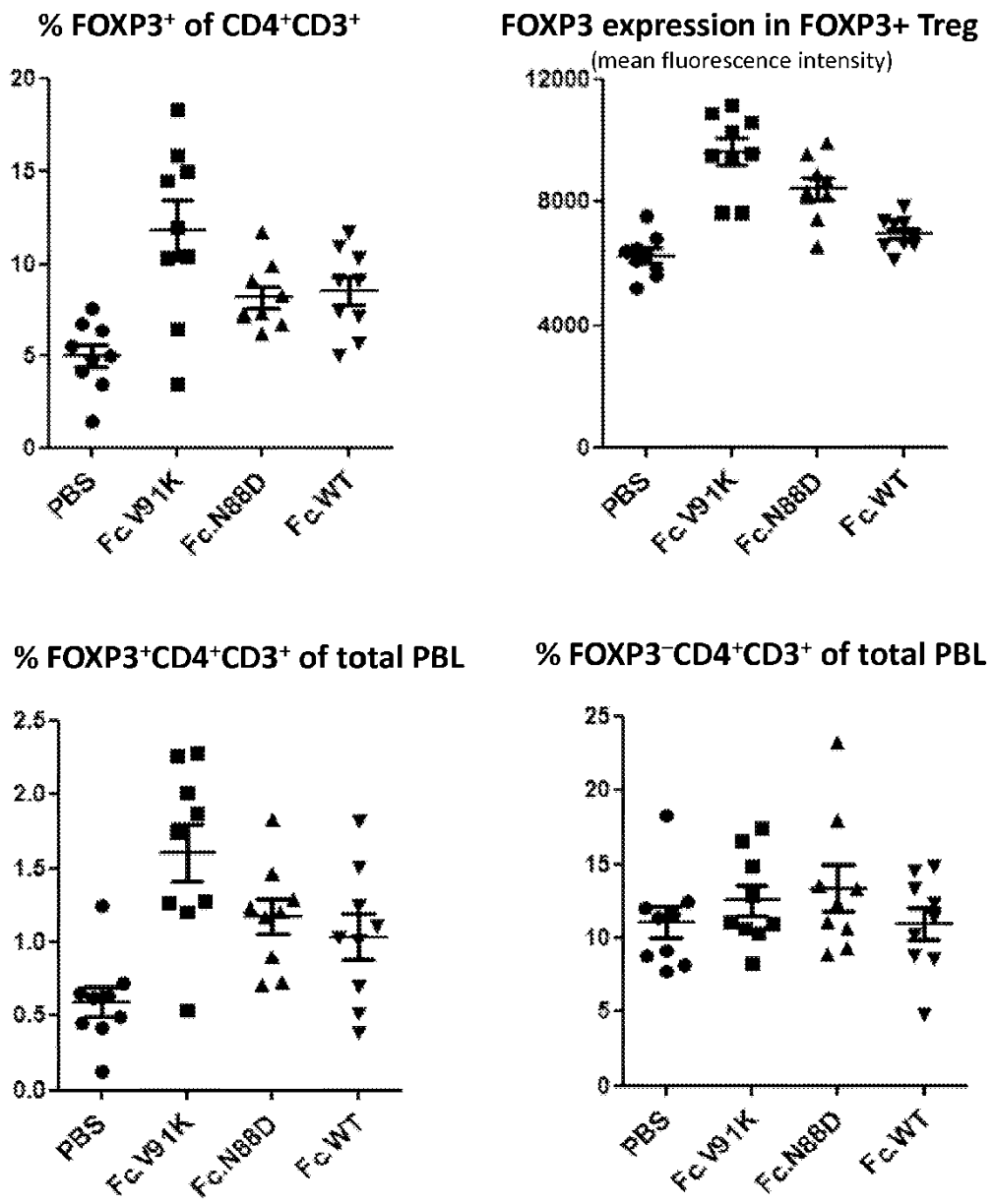
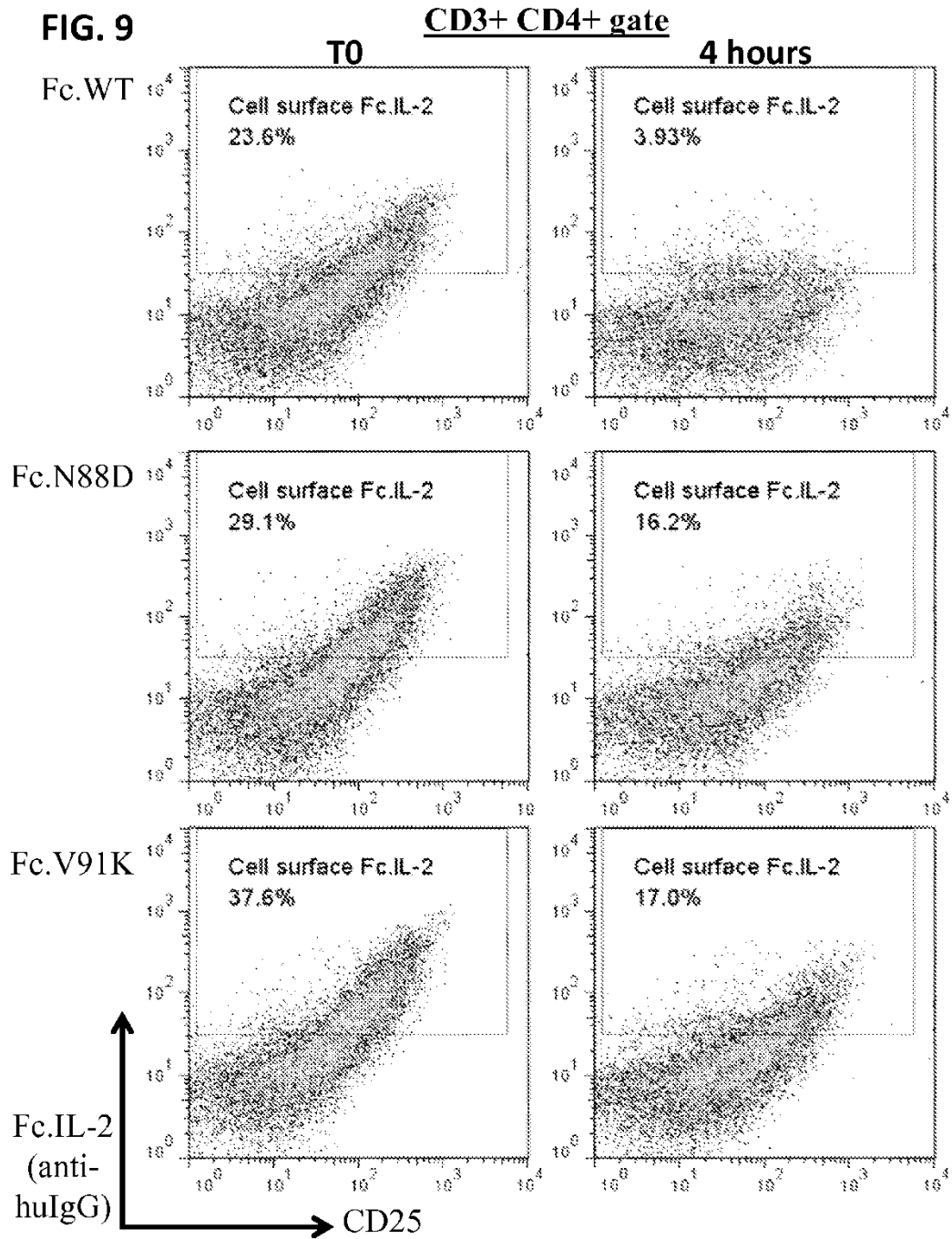


FIG. 7B

FIG. 8





ELENCO DELLE SEQUENZE

[0186]

<110> AMGEN INC.

<120> POLIPEPTIDI CONTENENTI Fc AGLICOSILATO

<130> A-1892-WO-PCT

<150> 61/784,669

<151> 14/03/2013

<160> 44

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val o Ala

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (125) .. (125)

<223> Cys, Ser, Val o Ala

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 4

<211> 226

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly
225

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 6

Gly Gly Asn Gly Thr
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 7

Tyr Gly Asn Gly Thr
1 5

<210> 8

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 8

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1			5						10					15	

Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		

Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35				40						45			

Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
	50					55					60				

Pro	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Leu	Ala	Pro	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65					70					75					80

Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asp	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85						90					95	

Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		

Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile
		115					120					125			

Ile	Ser	Thr	Leu	Thr
		130		

<210> 9

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 9

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Ser Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 11

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 11

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Ala Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 12

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 13

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 13

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Asp Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 14

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 14

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Arg Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 15

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Asp Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 16

<211> 364

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 16

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 17

<211> 364

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 18

<211> 364

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 19

<211> 364

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 19

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

	115						120						125						
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser				
	130						135					140							
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu				
	145				150					155					160				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				
				165					170					175					
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val				
			180					185					190						
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met				
		195					200					205							
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser				
	210					215						220							
Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys				
	225				230					235					240				
Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu				
				245					250					255					
Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr				
			260					265					270						
Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln				
		275					280					285							
Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Leu	Ala				
	290					295					300								
Pro	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asp	Ile				
	305				310					315					320				
Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys				
				325					330					335					
Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp				
			340					345					350						
Ile	Thr	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr								
		355					360												

<210> 20

<211> 364

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210								215									220
Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys		
225								230									240
Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu		
				245						250				255			
Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr		
			260					265						270			
Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln		
		275						280					285				
Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala		
	290					295					300						
Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asp	Ile		
305					310					315					320		
Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys		
				325					330					335			
Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp		
			340					345						350			
Ile	Thr	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr						
		355					360										

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Tag 6xHis sintetico

<400> 21

His	His	His	His	His	His
1				5	

<210> 22

<211> 42

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 22

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
20 25 30

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
35 40

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 23

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25 30

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 24

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
1 5 10 15

Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 25

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
1 5 10 15

Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20 25

<210> 26

<211> 27

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 26

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 27

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 28

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 29

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
1 5 10 15

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 30

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
1 5 10 15

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 31

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 32

<211> 28

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 32

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

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20 25

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 33

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

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 34

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

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20

<210> 35

<211> 28

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 35

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

Pro Asn Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 36

<211> 28

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 36

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

Pro Asn Ser Thr Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 37

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ala
 1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 38

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

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 39

<211> 226

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 39

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1				5					10					15	

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Cys Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Cys Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly
225

<210> 41

<211> 226

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 41

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly
225

<210> 42

<211> 227

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 42

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Cys Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Cys Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 43

<211> 227

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 43

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Cys Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Cys Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 44

<211> 227

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 44

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130						135									140
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				165					170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
210						215					220				
Pro	Gly	Lys													
225															