

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3401402

DAL TITOLO:

“LIGANDI MODIFICATI MEDIANTE PERMUTAZIONE CIRCOLARE
COME AGONISTI E ANTAGONISTI”

*** **

Descrizione

STATO DELL'ARTE DELL'INVENZIONE

Le interazioni ligando-recettore sono essenziali per un certo numero di vie di trasmissione del segnale cellulare. Fattori di crescita, citochine e altre proteine regolatrici utilizzano queste interazioni per mediare le risposte cellulari. Le proteine che inibiscono o facilitano questi processi hanno potenziale come sostanze terapeutiche.

Dati alcuni degli inconvenienti degli approcci degli anticorpi monoclonali nell'inibizione delle funzioni ligando-recettore come fabbricazione costosa, grandi dimensioni, penetrazione limitata nei tessuti ed effetti collaterali indesiderati, i ricercatori si stanno concentrando sull'utilizzo di proteine non anticorpali come agenti terapeutici. Inoltre, le strategie anticorpali terapeutiche sono generalmente limitate a inibizione, o antagonizzazione, di una via di trasmissione del segnale e non competenti affinché le strategie potenzino o agonizzino una via. Quindi, nuovi approcci di ingegnerizzazione delle proteine sono in fase di esplorazione in modo da sviluppare ligandi e recettori come agonisti e antagonisti di bersagli clinicamente importanti come alternativa alle strategie anticorpali.

La permutazione circolare implica il collegamento delle estremità native ammino e carbossi di una proteina, generalmente con un linker, e la creazione di nuovi terminali ammino e carbossi mediante scissione in corrispondenza di un nuovo sito all'interno della sequenza proteica, generalmente un'ansa; in modo che la sequenza primaria della proteina risultante sia riordinata, mentre la struttura secondaria (e l'attività) sia mantenuta. Quindi, la creazione di nuovi terminali può fornire posizioni migliori per l'attacco di un partner di fusione relativo ai terminali nativi.

La permutazione circolare di un ligando della proteina fornisce un mezzo mediante il quale una proteina può essere alterata in modo da produrre nuovi terminali carbossile e ammino senza diminuire la specificità e l'affinità di legame del ligando della proteina alterato per il suo bersaglio rispetto alla sua forma nativa. In aggiunta, i nuovi terminali possono essere spostati preferenzialmente in una posizione preferenziale per incorporare il ligando permutato circolarmente in un polipeptide di fusione e dimostrare una migliore attività rispetto a un polipeptide di fusione contenente il ligando nativo (permutato non circolarmente).

Ligandi permutati circolarmente sono divulgati in WO 95/27732. Proteine di fusione comprendenti un'interleuchina e il dominio di legame di un recettore di interleuchina sono divulgate in WO 2010/020766. La presente invenzione fornisce polipeptidi di fusione comprendenti ligandi modificati mediante permutazione circolare i quali operano da agonisti,

super agonisti o antagonisti di una via di trasmissione del segnale. Tali polipeptidi di fusione sono vantaggiosi nel trattamento di molti disturbi, condizioni, e malattie che si basano sull'interazione ligando-recettore e la trasduzione del segnale. Per esempio, tali polipeptidi di fusione che fungono da antagonisti di un recettore bersaglio hanno potenziale come sostanze terapeutiche per disturbi tumorali e autoimmuni. Tali polipeptidi di fusione che fungono da agonisti o superagonisti di una via di trasmissione del segnale hanno il potenziale, per esempio, in medicina tumorale o rigenerativa.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

In un primo aspetto, la presente invenzione fornisce un polipeptide di fusione comprendente amminoacidi da 1 a 303 di SEQ ID NO.: 26.

In un secondo aspetto, la presente invenzione fornisce un polipeptide di fusione del primo aspetto costituito da amminoacidi da 1 a 303 di SEQ ID NO.: 26.

In un terzo aspetto, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente il polipeptide di fusione del primo o secondo aspetto e un trasportatore farmaceuticamente accettabile.

In un quarto aspetto, la presente invenzione fornisce un acido nucleico isolato o ricombinante codificante il polipeptide di fusione del primo o secondo aspetto.

In un quinto aspetto, la presente invenzione fornisce un vettore



ricombinante comprendente l'acido nucleico del quarto aspetto.

In un sesto aspetto, la presente invenzione fornisce una cellula ospite comprendente il vettore del quinto aspetto.

In un settimo aspetto, la presente invenzione fornisce il polipeptide di fusione del primo o del secondo aspetto o la composizione farmaceutica del terzo aspetto per l'uso in medicina.

In un ottavo aspetto, la presente invenzione fornisce il polipeptide di fusione del primo o del secondo aspetto o la composizione farmaceutica del terzo aspetto per l'uso in un metodo terapeutico per agonizzare selettivamente IL-2R $\beta\gamma$ su una cellula, in cui il metodo comprende porre in contatto la cellula con il polipeptide di fusione del primo o del secondo aspetto o la composizione farmaceutica del terzo aspetto.

In un nono aspetto, la presente invenzione fornisce il polipeptide di fusione o la composizione farmaceutica per l'uso secondo l'ottavo aspetto, in cui il polipeptide di fusione o la composizione farmaceutica viene posto in a contatto con la cellula in maniera extracorporea.

In un decimo aspetto, la presente invenzione fornisce il polipeptide di fusione del primo o del secondo aspetto o la composizione farmaceutica del terzo aspetto per l'uso nel trattamento del cancro.

Nel presente documento sono divulgati polipeptidi di fusione comprendenti ligandi di polipeptidi che sono modificati mediante

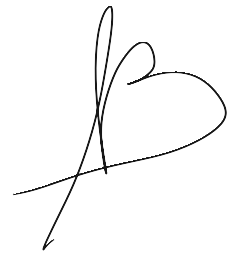
permutazione circolare e fusi ad almeno un partner di fusione dei polipeptidi in cui tali polipeptidi di fusione hanno funzioni o attività biologiche nuove, migliorate o potenziate relative all'analoga proteina di fusione e il ligando nativo (permutato non circolarmente). Tali miglioramenti includono, ma non in via limitativa, affinità di legame aumentata, attività aumentata, attività agonista aumentata (super agonista), attività antagonista aumentata, accessibilità aumentata, flessibilità aumentata del sito attivo, stabilità aumentata, specificità del substrato più ampia e/o cambiata, bersagliamento del tessuto potenziato, legame della proteina potenziato, bersagliamento della membrana potenziato, parametri farmacocinetici migliorati, proprietà fisiche migliorate e combinazioni degli stessi.

I ligandi permutati circolarmente possono comprendere tutte o qualsiasi porzione delle loro catene polipeptidiche native, e possono in via opzionale includere connettori. I ligandi permutati circolarmente sono progettati per essere orientati in modo ottimale in modo che essi possano essere fusi ad almeno un partner di fusione polipeptidico desiderato senza compromettere l'attività, quale l'affinità di legame del ligando modificato per il suo bersaglio. I ligandi permutati (modificati) circolarmente dei polipeptidi di fusione possono essere almeno attivi quanto, e sono preferibilmente più attivi di, le loro proteine native corrispondenti. Nel presente documento sono divulgate le proteine di fusione che hanno una maggiore affinità di legame per le loro proteine bersaglio. L'affinità di legame della proteina di fusione per la sua

proteina bersaglio può essere almeno 5 volte, preferibilmente almeno 10 volte, preferibilmente almeno 20 volte o più, superiore all'affinità del ligando nativo per il bersaglio della proteina. Il polipeptide di fusione può avere un'affinità di legame almeno 10 volte superiore all'affinità di legame per il recettore.

I ligandi possono essere selezionati dal gruppo che include, ma non in via limitativa, citochine, linfocine, chemochine, adipochine, fattori di crescita, ormoni, molecole di adesione cellulare e neurotrasmettitori. I partner di fusione polipeptidici possono essere qualsiasi polipeptide che fornisce un miglioramento alla proteina nativa. Per esempio, i partner di fusione possono essere selezionati dal gruppo che include, ma non in via limitativa, tutti o una porzione di: glicoproteine, proteoglicani, molecole di trasmissione del segnale cellulare, proteine accessorie, recettori solubili, recettori legati alla membrana, recettori della transmembrana, anticorpi, enzimi, polipeptidi bersaglianti (per esempio nanocorpi), mucine o peptidi simili a mucine, polipeptidi sintetici o qualsiasi combinazione degli stessi. Miglioramenti includono, ma non in via limitativa, miglioramenti di affinità, agonismo, antagonismo, aggiunta di attività funzionale sinergica, bersagliamento del tessuto, bersagliamento della proteina, bersagliamento della membrana, parametri farmacocinetici (per esempio emivita), o proprietà fisiche (per esempio solubilità).

Come divulgato nel presente documento, almeno un partner di fusione polipeptidico comprende tutta o una porzione di una subunità



del recettore bersaglio o altra molecola coinvolta nella sua naturale via di trasduzione del segnale. Resta inteso che un partner di fusione polipeptidico può comprendere un polipeptide che sia omologo almeno per il 60%, almeno per il 70%, almeno per l'80% o almeno per il 90% a tutta o a una porzione di una subunità del recettore bersaglio o altra molecola coinvolta in una via di trasduzione del segnale.

Nel presente documento sono divulgati polipeptidi di fusione comprendenti un ligando modificato e un partner di fusione polipeptidico che sono ulteriormente collegati a un secondo partner di fusione. Esempi di secondi partner di fusione includono tutta o qualsiasi porzione di un anticorpo (per esempio la regione Fc di un anticorpo) e qualsiasi dei tipi di polipeptidi adeguati come un primo partner di fusione descritto sopra.

Nel presente documento sono divulgati i polipeptidi di fusione che operano come agonisti nuovi e migliorati (super agonisti), o antagonisti di un recettore come un recettore cellulare che è coinvolto nella trasduzione del segnale di una via di trasmissione del segnale cellulare. I polipeptidi di fusione possono legare un recettore bersaglio monomero, dimerico, o multimerico e possono inibire o potenziare la dimerizzazione, la trimerizzazione o la multimerizzazione del recettore e/o inibire o potenziare la trasduzione del segnale e la trasmissione del segnale a valle di una via cellulare.

Nel presente documento è divulgato un polipeptide di fusione comprendente, un primo partner di fusione polipeptidico collegato a un

ligando modificato corrispondente a un ligando nativo specifico per un recettore bersaglio, in cui il ligando modificato è stato permutato circolarmente in modo da creare un nuovo N-terminale e un nuovo C-terminale rispetto al ligando nativo, e in cui il nuovo N-terminale o il nuovo C-terminale del ligando modificato è collegato a un primo partner di fusione polipeptidico in modo da formare un polipeptide di fusione che in via opzionale ha affinità aumentata per il recettore bersaglio rispetto al ligando nativo per il recettore, e in cui in seguito all'associazione del polipeptide di fusione con il recettore bersaglio il polipeptide di fusione super agonizza o antagonizza l'attività del recettore bersaglio. Il nuovo C-terminale e il nuovo N-terminale del ligando modificato non possono interrompere alcun dominio di legame del ligando modificato per il recettore bersaglio.

Il recettore bersaglio può funzionare mediante formazione per gradi di un'attivazione multimerica complessa per innescare la trasduzione del segnale di una via cellulare di trasmissione del segnale e in cui in seguito al legame del polipeptide di fusione al recettore, la trasduzione del segnale è super agonizzata o antagonizzata.

Il polipeptide di fusione può legare il recettore e potenziare la formazione per gradi del complesso di attivazione multimerico super agonizzando pertanto la trasduzione del segnale mediante il recettore bersaglio.

Il polipeptide di fusione può legare il recettore e ostacola stericamente la formazione per gradi del complesso multimerico

antagonizzando pertanto la trasduzione del segnale mediante il recettore bersaglio.

Nel presente documento è divulgato un polipeptide di fusione comprendente il ligando modificato e un primo partner di fusione in cui il primo partner di fusione del ligando modificato è derivato da tutta o una porzione della proteina con cui il ligando nativo del recettore bersaglio sarebbe associato nella prima fase della formazione per gradi del complesso di attivazione multimerico del recettore. Il polipeptide di fusione può comprendere la proteina modificata e un partner di fusione in cui il partner di fusione della proteina modificata è derivato da tutta o una porzione della proteina con cui la proteina nativa del recettore bersaglio sarebbe associata nelle fasi a valle della formazione per gradi del complesso di attivazione multimerico del recettore.

Il partner di fusione dell'eterodimero può essere fuso al ligando modificato in una posizione che è orientata in modo da potenziare la formazione per gradi del complesso di attivazione multimerico del recettore.

Il primo partner di fusione dell'eterodimero può essere fuso al ligando modificato in una posizione che è orientata in modo da ostacolare stericamente la formazione del complesso di attivazione multimerico del recettore.

Il polipeptide di fusione può essere un omodimero comprendente la proteina modificata e un partner di fusione in cui il partner di fusione del ligando modificato è derivato da tutto o una



porzione dello stesso ligando dove l'omodimerizzazione è richiesta per la formazione del complesso di attivazione multimerico del recettore.

Nel presente documento è divulgato un metodo per super agonizzare un recettore bersaglio comprendente la fase di messa a contatto del recettore con il polipeptide di fusione dell'invenzione.

Nel presente documento è divulgato un metodo per antagonizzare un recettore bersaglio comprendente la fase di messa a contatto del recettore con un polipeptide di fusione dell'invenzione.

Nel presente documento è divulgato un metodo per preparare un polipeptide di fusione dell'invenzione comprendente le fasi di: a) selezione di un ligando nativo che si lega a un recettore in cui il recettore opera mediante formazione per gradi di un complesso di attivazione multimerico per innescare la trasduzione del segnale di una via cellulare di trasmissione del segnale; b) creazione di un ligando modificato mediante permutazione circolare in modo da fornire un ligando modificato avente un nuovo N-terminale e un nuovo C-terminale rispetto al ligando nativo di fase (a); e c) collegamento di un primo partner di fusione polipeptidico all'N- o C-terminale del ligando modificato di fase (b) in modo da preparare un polipeptide di fusione, in cui i nuovi N- o C-terminali del ligando modificato sono posizionati in modo da permettere al primo partner di fusione di essere collegato al ligando modificato in una posizione orientata in modo da antagonizzare o super agonizzare la funzione del recettore bersaglio in seguito al legame del polipeptide di fusione rispetto al recettore bersaglio. Il

metodo può ulteriormente comprendere la fusione di un secondo partner di fusione al ligando modificato di fase (b) in cui il secondo partner di fusione fornisce un miglioramento aggiuntivo alla proteina, come l'estensione dell'emivita del polipeptide di fusione *in vivo*. Altri miglioramenti che potrebbero essere ingegnerizzati tramite la fase (c) includono, ma non in via limitativa, aggiunta di attività funzionale sinergica, bersagliamento dell'organo, bersagliamento del tessuto, bersagliamento della proteina, bersagliamento della membrana, bersagliamento della matrice biologica, proprietà farmacocinetiche (per esempio biodisponibilità percentuale) o fisiche (per esempio solubilità).

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La Figura 1. Struttura del complesso di trasmissione del segnale esamerico di IL6 umano (PDB: 1P9M). Vista laterale (dall'alto) e vista dall'alto (dal basso) del complesso esamerico costituito da due molecole IL-6 (grigio scuro), due molecole IL-6R α solubili (D2-D3 della subunità α del recettore di IL6, nero), e due molecole gp130 solubili (D1-D2-D3, grigio chiaro).

La Figura 2. Illustrazione del processo di permutazione circolare utilizzando la proteina a fascio di 4 eliche, IL-6. Rappresentazione a nastro della struttura cristallina di IL-6 (PDB 1P9M, in alto a sinistra) e della struttura modellata di una IL-6 permutata circolarmente (RDB1503, in alto a destra). I terminali N e C sono etichettati come eliche A, B, C, D secondo la nomenclatura standard di IL-6. La proteina permutata circolarmente è stata ingegnerizzata

collegando i terminali nativi e creando nuovi terminali tra le eliche C e D dell'IL-6 nativa. Il risultato finale della permutazione circolare è il riposizionamento dei terminali sulla faccia opposta di IL-6. Le sequenze amminoacidiche per IL-6 (residui 47-212 di SEQ ID NO: 3) e RDB1503 (SEQ ID NO: 1) (al centro e in basso, rispettivamente) evidenziano la sequenza riordinata. Il nuovo N-terminale di RDB1503 precede immediatamente l'elica D. L'area ombreggiata all'interno della rappresentazione a nastro e la sequenza proteica di RDB1503 evidenziano il linker creato per collegare i terminali N e C dell'IL-6 nativa.

La Figura 3. Modello molecolare che illustra l'orientamento relativo di D1 (dominio 1 di gp130) quando fuso a IL-6 (FIG. 3A) e RDB1503 (FIG. 3B), determinando proteine di fusione RDB1529 e RDB1527, rispettivamente. Il dominio D1 è ombreggiato allo scopo di evidenziarlo. Porzioni di gp130 e IL-6R α nel complesso esamerico attivo sono incluse per riferimento. Il dominio D1 di RDB1529 punta lontano dall'interfaccia di legame di gp130 nel complesso attivo esamerico ed è pertanto predetto non essere in grado di antagonizzare efficacemente il segnale (FIG. 3A). Al contrario, il dominio D1 di RDB1527 partecipa nel legame a IL-6R α e occupa lo spazio occupato dalla seconda molecola di gp130 nel complesso esamerico, antagonizzando così efficacemente il segnale (FIG. 3B).

La Figura 4. Curve dose-risposta per IL-6 (\blacktriangle) e RDB1503 (\odot) nel saggio cellulare HEK-Blue™. L'EC₅₀ è stimato a 1 pM e 0,6 pM, per

IL-6 e RDB1503, rispettivamente.

La Figura 5. Inibizione della trasmissione del segnale di IL6 mediante RDB1527 nel saggio cellulare HEK-Blue™. Attività di IL6 (—✕—) come funzione della sua concentrazione in assenza di inibizione. L'inibizione mediante RDB1527(—⚡—) e RDB1529 (—⚡—) sono state misurate in presenza di 12,5 pM di IL6. Tutte le misurazioni sono state fatte in duplicato. Il valore stimato di IC₅₀ per RDB1527 è di 0,22 nM. RDB1529 non ha mostrato solida attività inibitoria.

La Figura 6. Misurazioni della risonanza plasmonica di superficie (SPR) dell'IL-6R α solubile che si lega a IL-6 immobilizzata (FIG. 6A), RDB1529 (FIG. 6B), e RDB1527 (FIG. 6C). Sensogrammi e curve interpolate sono in grigio e nero, rispettivamente. I parametri cinetici calcolati dai dati sono nelle tabelle inserite.

La Figura 7. Struttura del complesso di trasmissione del segnale IL-1 β umano (PDB: 4DEP; FIG. 7A) e una rappresentazione modellata della formazione del complesso potenziale mediata da RDB1538 (CP_IL-1 β _IL-1RI (D1-D2); FIG. 7B). IL-1 β (evidenziata con una freccia nella struttura) si lega ai recettori di IL-1RI (nero, che emerge rispetto al piano) e IL-1RAcP (grigio chiaro, che rientra rispetto al piano). I terminali N e C nativi di IL-1 β non sono in stretta prossimità rispetto al C-terminale del dominio D1-D2 di IL-1RI. I terminali dell'IL-1 β ingegnerizzata permutata circolarmente sono ora prossimali al C-terminale del dominio D1-D2 di IL-1RI, facilitando quindi la generazione della proteina di fusione. L'area ombreggiata evidenzia il linker che

collega la variante di IL-1 β permutata circolarmente al recettore di IL-1RI.

La Figura 8. Struttura del complesso di trasmissione del segnale di IL2 umana (PDB: 2ERJ; FIG. 8A) e complesso di trasmissione del segnale modellato mediato da RDB1405 (CP_IL-2_IL-2R α ; FIG. 8B). IL2 (evidenziata con una freccia nella struttura) si lega ai recettori di IL2R α (grigio, in alto a sinistra nel complesso), IL2R β (grigio chiaro, in basso a sinistra nel complesso) e γ_c (nero, in basso a destra nel complesso). IL-2R α stabilizza la conformazione di IL-2 per potenziare la sua affinità di legame a IL-2R β . I terminali N e C nativi di IL-2 sono sulla faccia distale all'interfaccia IL-2/IL-2R α . I terminali dell'IL-2 ingegnerizzata permutata circolarmente sono ora prossimali all'interfaccia IL-2/IL-2R α , facilitando quindi la generazione della proteina di fusione. L'area ombreggiata evidenzia il linker che collega la variante di IL-2 permutata circolarmente al recettore di IL-2R α .

La Figura 9. È un diagramma che mostra complessi di trasmissione del segnale rappresentativi per citochine e fattori di crescita che illustrano l'assemblaggio multimerico che porta all'attivazione.

La Figura 10. È un diagramma che rappresenta il meccanismo di antagonismo mediante Picasso3_D1. Determinanti di legame da IL-6 e D1 (dominio di gp130) sono entrambi presenti nella proteina di fusione ibrida che determina legame di alta affinità a IL-6R α . Dopo che Picasso3_D1_Fc si è legato a IL-6R α , l'assemblaggio del complesso di

trasmissione del segnale dell'IL-6 non può procedere, determinando antagonismo.

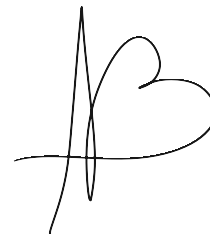
FIGG. 11A e 11B. Risposta delle cellule HH (sinistra) e delle cellule CTLL-2 (destra) a varianti di IL-2 di tipo selvatico (Proleuchina) e di IL-2 ingegnerizzate.

FIGG. 12A e 12B Risposta delle cellule HH (sinistra) e delle cellule CTLL-2 (destra) a varianti di IL-15 di tipo selvatico e IL-15 ingegnerizzata.

La Figura 13. Struttura del complesso di trasmissione del segnale di IL-15 modellato per le proteine di fusione CP-IL-15-IL-15R α generate mediante sovrapposizione del complesso IL-15/IL-15R α (2Z3Q.pdb sulle catene IL-R β e IL-2R γ dalla struttura del complesso di trasmissione del segnale ternario di IL-2, 2ERJ.pdb). Il "Linker" che unisce i terminali nativi di IL-15 per creare la variante di IL-15 permutata circolarmente e il "Distanziatore" per creare la fusione CP-IL-15-IL-15R α sono evidenziati con frecce. Si noti che i terminali nativi di IL-15 (posizionati originariamente in corrispondenza del sito del "Linker") sono orientati distalmente lontani dall'interfaccia di legame di IL-15R α , creando quindi l'esigenza di permutazione circolare del ligando.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Segue una descrizione dettagliata di forme di realizzazione preferite dell'invenzione. Nel presente documento è divulgata una proteina di fusione polipeptidica che presenta un ligando di IL-6 permutato circolarmente fuso a una porzione di gp130. Resta inteso



che le funzioni biologiche, le attività e altre caratteristiche delle forme di realizzazione descritte sono generalmente applicabili ad altri polipeptidi di fusione comprendenti ligandi modificati mediante permutazione circolare fusi a partner di fusione polipeptidici.

Come usate nella descrizione e nelle rivendicazioni allegate, le forme singolari "un'/un/uno/una", e "il/lo/la" includono anche i riferimenti plurali se il contenuto non afferma chiaramente altro. Quindi, per esempio, il riferimento a "un partner di fusione polipeptidico" include una pluralità di partner di fusione polipeptidici. In questa descrizione e nelle rivendicazioni che seguono si farà riferimento a un certo numero di termini che per definizione avranno i seguenti significati, a meno che non sia evidente un'intenzione contraria.

Definizioni

I termini "permutazione circolare" e "permutato/a circolarmente" "(CP)" come utilizzati nel presente documento si riferiscono al processo concettuale di prendere una proteina lineare, o la sua sequenza di acido nucleico affine, e fondere i terminali N- e C- nativi (direttamente o attraverso un linker, utilizzando metodologie di proteine o DNA ricombinante) in modo da formare una molecola circolare, e poi tagliare (aprire?) la molecola circolare in una posizione differente in modo da formare una nuova proteina lineare, o molecola di acido nucleico affine, con terminali differenti dai terminali nella molecola originale. La permutazione circolare conserva quindi la sequenza, la struttura e la funzione di una proteina (diversa da linker opzionale), generando al

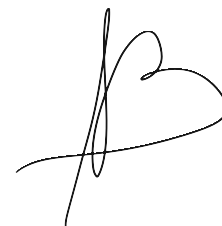
contempo nuovi terminali C- e N- in posizioni differenti che, in conformità a un aspetto dell'invenzione, determina un orientamento migliore per la fusione di un partner di fusione polipeptidico desiderato rispetto al ligando originale. La permutazione circolare include anche qualsiasi processo che determina una molecola a catena lineare permutata circolarmente, come definito nel presente documento. In generale, una molecola permutata circolarmente è *de novo* espressa come una molecola lineare e formalmente non attraversa le fasi di circolarizzazione e apertura. La particolare permutazione circolare di una molecola, nel presente documento, è designata mediante parentesi contenenti, nel caso di una proteina permutata circolarmente, i residui amminoacidici tra i quali il legame peptidico è eliminato. Per esempio, la designazione IL6(Q182/Q180) designa un fattore di crescita di IL6 permutata circolarmente in cui il sito di apertura (posizione in cui il legame peptidico è eliminato) si verifica tra i residui Q182 e Q180 dell'IL6 nativa non permutata o non modificata, e quindi l'N-terminale appena creato è una Glutamina che è stata in precedenza residuo 182, e il C-terminale appena creato è una Glutamina che è stata in precedenza residuo 180.

Un "distanziatore" come utilizzato nel presente documento si riferisce a un peptide che unisce le proteine comprendenti una proteina di fusione. Generalmente il distanziatore non ha alcuna attività biologica specifica e il suo scopo è meramente quello di unire le proteine o di conservare una certa distanza minima o altra relazione spaziale tra di

loro. Tuttavia, gli amminoacidi costituenti di un distanziatore possono essere selezionati sulla base di alcune proprietà del linker o della molecola risultante come la flessibilità, l'idrofilicità, la carica netta, o la suscettibilità proteolica o la mancanza delle stesse e la mancanza di immunogenicità.

I termini ligando, polipeptide, proteina, citochina o fattore di crescita “non permutato/a”, “nativo/a”, “di tipo selvatico” o “non modificato/a” sono utilizzati nel presente documento per fornire un punto di riferimento per il ligando, la citochina, il fattore di crescita o la proteina prima della relativa trasposizione in una molecola permutata circolarmente, come descritto sopra. Tipicamente, il ligando, il fattore di crescita o la proteina non modificato/a ha terminali ammino e carbossi e una sequenza amminoacidica che corrispondono sostanzialmente ai terminali ammino e carbossi e alla sequenza amminoacidica del ligando, fattore di crescita o proteina o un dominio indipendente di una proteina, come si verifica generalmente *in vivo*. Il ligando, il fattore di crescita o la proteina può essere una forma completamente matura o un precursore della forma matura (come una pro-proteina).

Il termine “ligando” è utilizzato nel presente documento generalmente per denotare qualsiasi polipeptide (nativo, endogeno o modificato in conformità all'invenzione) che si lega a una seconda proteina o recettore ed è un componente di vie biochimiche. Un ligando può influenzare direttamente o indirettamente (per esempio indurre, inibire) l'attività del recettore (per esempio trasmissione del segnale,



adesione).

Il termine “ligando modificato” è utilizzato nel presente documento per indicare un ligando che è stato modificato mediante permutazione circolare rispetto al ligando nativo corrispondente.

“Attività” o “attività biologica” si riferiscono a una funzione o un effetto biologica/o *in vitro* o *in vivo*, che include ma non è limitato al legame con il recettore, all’attività antagonista, all’attività agonista o a una risposta cellulare o fisiologica.

Un “agonista” è un polipeptide di fusione divulgato nel presente documento il quale è in grado di legarsi a un recettore desiderato in modo da determinare un complesso di recettori attivato. Un “superagonista” è un polipeptide di fusione divulgato nel presente documento in grado di legare il recettore bersaglio e che fornisce attivazione potenziata del complesso di recettori rispetto al ligando nativo per quel recettore bersaglio. L’attivazione mediante il superagonista del polipeptide di fusione dell’invenzione può essere potenziata almeno due volte, e preferibilmente almeno 5 volte, preferibilmente almeno 10 volte o preferibilmente almeno 20 volte o più rispetto all’attivazione del recettore bersaglio mediante il ligando nativo. Un polipeptide di fusione dell’invenzione “avente attività agonista” si riferisce al fatto che i polipeptidi di fusione sono in grado di legarsi e di attivare o superagonizzare almeno un recettore.

Un “antagonista” è un polipeptide di fusione divulgato nel presente documento che è in grado di legarsi a un recettore desiderato

ma non è in grado di mediare i cambiamenti di assemblaggio conformazionali o molecolari completi delle molecole del recettore necessari per determinare un complesso attivato e mediante il quale l'attivazione del recettore mediata dal ligando nativo è sostanzialmente inibita. L'attivazione del recettore in seguito al legame di un ligando adeguato generalmente implica un cambiamento conformazionale del recettore o una differenza di stati di associazione del recettore, per esempio oligomerizzazione delle subunità del recettore o reclutamento di proteine o recettori aggiuntivi.

Il termine "recettore" è inteso indicare una proteina presente su una superficie cellulare (o un recettore solubile non presente sulla superficie cellulare ma che ha o si associa a un recettore di superficie cellulare equivalente) con cui si lega un ligando. I recettori della superficie cellulare sono tipicamente composti da domini o subunità differenti con funzioni differenti, come un dominio extracellulare (o domini) contenente la regione con cui interagisce il ligando, un dominio transmembrana o domini (o in alcuni casi un lipide di ancoraggio) che ancora il recettore nella membrana cellulare. In alcuni casi è anche presente un dominio effettore intracellulare che avvia un segnale cellulare in risposta al legame con il ligando (trasduzione del segnale). I recettori solubili sono tipicamente composti da uno o più domini extracellulari derivanti da clivaggio protolitico dalla regione di ancoraggio della membrana.

I "recettori bersaglio" o "ligandi bersaglio" secondo l'invenzione

sono le molecole a cui i polipeptidi di fusione dell'invenzione sono designati legarsi direttamente. In una forma di realizzazione "recettori bersaglio" secondo l'invenzione sono in grado di legarsi in definitiva o di associarsi altrimenti con molecole di trasmissione del segnale (per esempio ligandi) nell'innescò della trasduzione del segnale di una via cellulare di trasmissione del segnale.

Un recettore che è attivato mediante la "formazione per gradi di un complesso di attivazione multimerico" è un recettore che, in aggiunta al legame di uno o più ligandi, richiede l'interazione di una o più subunità proteiche aggiuntive in un processo noto come dimerizzazione, trimerizzazione, multimerizzazione, complessazione, o oligomerizzazione (indicato anche nell'arte come "aggregazione") per ottenere completamente la trasduzione del segnale di una via di trasmissione del segnale cellulare. Il recettore può già essere sotto forma di un dimero o multimero prima del legame con il ligando e in seguito al legame con il ligando può reclutare ulteriori proteine solubili o ancorate alla membrana in una maniera per gradi in modo da costruire il complesso di attivazione multimerico completamente funzionante.

Il "raggio idrodinamico" è il raggio apparente (R_h in nm) di una molecola in una soluzione calcolata da proprietà diffusionali. Il "raggio idrodinamico" di una proteina influenza la sua velocità di diffusione in acqua. Il raggio idrodinamico di una proteina è influenzato dal suo peso molecolare nonché dalla sua struttura, inclusa forma e compattezza, e dal suo stato di idratazione. Metodi per determinare il raggio

idrodinamico sono ben noti nell'arte, come mediante l'utilizzo di DLS e cromatografia di esclusione dimensionale. La maggior parte delle proteine hanno struttura globulare, che è la struttura tridimensionale più compatta che può avere una proteina con il raggio idrodinamico più piccolo. Alcune proteine adottano una conformazione casuale e aperta, non strutturata, o "lineare" e di conseguenza hanno un raggio idrodinamico più largo rispetto alle tipiche proteine globulari di peso molecolare simile.

Un "polipeptide del dominio delle mucine" è definito nel presente documento come qualsiasi proteina comprendente un "dominio delle mucine". Un dominio delle mucine è ricco di potenziali siti di glicosilazione, e ha un alto contenuto di serina e/o treonina e prolina, che può costituire più del 40% degli amminoacidi. Un dominio delle mucine è pesantemente glicosilato con glicani prevalentemente O-legati.

Il termine "connettore" o "sequenza di connettore", come utilizzato nel presente documento, si riferisce alla sequenza peptidica che è utilizzata per unire i terminali ammino e carbossi di una proteina (o la sua corrispondente sequenza di acido nucleico codificante la proteina) attraverso legami covalenti al terminale ammino e carbossi. In alcune forme di realizzazione, la proteina permutata circolarmente è prodotta collegando le estremità della sequenza corrispondente di DNA o RNA, formando vari permutanti tagliando la sequenza di acido nucleico circolarizzata, e traducendo successivamente le sequenze di

acido nucleico in modo da formare la(e) proteina(e) permutata(e) circolarmente.

Il termine “residuo” come utilizzato nel presente documento si riferisce a un amminoacido che è incorporato in un peptide. L'amminoacido può essere un amminoacido presente in natura e, se non altrimenti limitato, può racchiudere analoghi noti di amminoacidi naturali che possono operare in una maniera simile agli amminoacidi presenti in natura.

Il termine “sito di apertura”, come utilizzato nel presente documento quando si riferisce alla permutazione circolare, si riferisce alla posizione in cui il legame peptidico sarebbe eliminato in modo da formare nuovi terminali ammino e carbossi, mediante manipolazione proteica o di acido nucleico. Il sito di apertura è designato mediante le posizioni della coppia di amminoacidi, posizionati tra i terminali ammino e carbossi della proteina non permutata (nativa) che diventano i nuovi terminali ammino e carbossi della proteina permutata circolarmente. Per esempio, in IL6 (Q182/Q180), l’N-terminale appena creato (il nuovo punto di partenza dell’IL-6 permutata circolarmente) è equivalente (strutturalmente) a Q182 dell’IL-6 nativa e il C-terminale appena creato (l’ultimo residuo dell’IL-6 permutata circolarmente) è equivalente (strutturalmente) a Q180 dell’IL-6 nativa. Il residuo 181 dell’IL-6 nativa è stato eliminato nel creare il sito di apertura.

I termini “polipeptidi” e “proteina” sono utilizzati in modo intercambiabile nel presente documento e includono proteine e

frammenti delle stesse. I polipeptidi sono divulgati nel presente documento come sequenze di residuo amminoacidico. Queste sequenze sono scritte da sinistra a destra nella direzione dal terminale ammino al terminale carbossi. In conformità alla nomenclatura standard, le sequenze di residui amminoacidici sono denominate mediante un codice a tre lettere o a singola lettera come indicato di seguito: alanina (Ala, A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), acido aspartico (Asp, D), cisteina (Cys, C), glutammina (Gln, Q), acido glutammico (Glu, E), glicina (Gly, G), istidina (His, H), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptofano (Trp, W), tirosina (Tyr, Y) e valina (Val, V).

Tutte le posizioni amminoacidiche descritte nel presente documento utilizzano come cornice di riferimento sequenze per la proteina nativa. Per esempio, IL-1 β nativa (SEQ ID N.: 19), IL-6 nativa (SEQ ID N.: 3), IL-2 nativa (SEQ ID N.: 20), gp130 nativa (SEQ ID N.: 21), IL-1RI nativa (SEQ ID N.: 22), e IL-2R α nativa (SEQ ID N.: 23) come presentate nell'Elenco delle sequenze. Per esempio, una molecola di IL-6 "comprendente amminoacidi da 47 a 212" si riferirebbe a una molecola avente amminoacidi che corrispondono sostanzialmente a quelle posizioni in SEQ ID N.: 3. Altri riferimenti comuni sono utilizzati nel presente documento in modo da indicare delezioni o sostituzioni in una sequenza utilizzando sequenze di riferimento, le rispettive sequenze native come descritto nell'elenco

delle sequenze o il cui numero di accesso GenBank è fornito nel presente documento. Le sostituzioni amminoacidiche possono essere indicate mediante parentesi, per esempio “(Ser 287)” si riferisce a una molecola avente serina in corrispondenza della posizione amminoacidica 287. Le molecole permutate circolarmente sono designate mediante la molecola nativa seguita da parentesi che racchiude le posizioni amminoacidiche che comprendono il sito di apertura. Quindi, per esempio, IL6 (182/180) designa un’IL6 permutata circolarmente in cui il nuovo terminale ammino è in corrispondenza del residuo amminoacidico 182, e il nuovo terminale carbossi è in corrispondenza del residuo amminoacidico 180 dell’IL6 nativa non permutata. È riconosciuto che alcune sostituzioni, aggiunta, o delezioni possono essere apportate a qualsiasi sequenza descritta nel presente documento che non alterano l’attività biologica della regione. Infatti, alcune di tali modifiche possono essere necessarie per ottenere l’espressione di una proteina particolare. Quindi, per esempio, una metionina può essere aggiunta a una sequenza per fornire un iniziatore.

“Variante” si riferisce a un polipeptide che differisce da un polipeptide di riferimento, ma mantiene proprietà essenziali. Una variante tipica di un polipeptide differisce nella sua sequenza amminoacidica primaria da un altro polipeptide di riferimento. In generale, le differenze sono limitate in modo che le sequenze del polipeptide di riferimento e la variante siano strettamente analoghe nel complesso e, in molte regioni, identiche. Una variante e un polipeptide

di riferimento possono differire nella sequenza amminoacidica per una o più modificazioni (per esempio, sostituzioni, addizioni e/o delezioni). Un residuo amminoacidico sostituito o inserito può o non può essere uno codificato dal codice genetico. Una variante di un polipeptide può essere presente in natura come una variante allelica, o può essere una variante che non è nota per essere presente in natura. In aggiunta, il termine “variante” come utilizzato nel presente documento include permutazioni circolari di proteine e peptidi.

Il termine “anticorpo”, come utilizzato nel presente documento, include varie forme di anticorpi modificati o alterati, come un'immunoglobulina intatta, un frammento Fc comprendente la regione costante delle catene pesanti, un frammento Fv contenente solo le regioni variabili di catena leggera e pesante, un frammento Fv collegato mediante un ponte disolfuro, un frammento Fab o (Fab)₂ contenente le regioni variabili e parti delle regioni costanti, un anticorpo a catena singola e simili.

Come utilizzato nel presente documento, “trattamento” o “trattare” o “palliazione” o “miglioramento” sono utilizzati in modo intercambiabile nel presente documento. Questi termini si riferiscono a un approccio per ottenere risultati benefici o desiderati inclusi, ma non in via limitativa, un beneficio terapeutico e/o un beneficio profilattico. Per beneficio terapeutico si intende l'eliminazione o il miglioramento del disturbo sottostante che è trattato. Inoltre, un beneficio terapeutico è ottenuto con l'eliminazione o il miglioramento di uno o più dei sintomi

fisiologici associati al disturbo sottostante in modo che si osserva un miglioramento nel soggetto, sebbene il soggetto possa essere ancora affetto dal disturbo sottostante. Per il beneficio profilattico, le composizioni possono essere somministrate a un soggetto a rischio di sviluppare una particolare malattia o a un soggetto che riferisce uno o più sintomi fisiologici di una malattia, sebbene possa non essere stata formulata una diagnosi di questa malattia.

Un “effetto terapeutico”, come utilizzato nel presente documento, si riferisce a un effetto fisiologico, inclusi ma non limitati a cura, attenuazione, miglioramento o prevenzione di malattia negli esseri umani o altri animali, o al potenziare diversamente il benessere fisico o mentale di essere umani o animali, causato da una proteina di fusione dell'invenzione diversa dalla capacità di indurre la produzione di un anticorpo contro un epitopo antigenico posseduto dalla proteina attiva. La determinazione di una quantità terapeuticamente efficace rientra nella capacità dei tecnici del ramo, specialmente alla luce della divulgazione dettagliata fornita nel presente documento.

I termini “quantità terapeuticamente efficace” e “dose terapeuticamente efficace”, come utilizzati nel presente documento, si riferiscono a una quantità di una proteina attiva, da sola o come parte di una composizione di proteine di fusione, che è in grado di avere qualsiasi effetto rilevabile, benefico su qualsiasi sintomo, aspetto, parametro misurato o caratteristiche di uno stato o condizione patologico/a quando somministrata in una dose o dose ripetute a un

soggetto. Tale effetto non deve essere assoluto per essere benefico.

Il termine “regime posologico terapeuticamente efficace”, come utilizzato nel presente documento, si riferisce a un programma di dosi somministrate consecutivamente di una proteina attiva, da sola o come parte di una composizione di proteine di fusione, in cui le dosi sono somministrate in quantità terapeuticamente efficaci in modo da determinare un effetto benefico prolungato su qualsiasi sintomo, aspetto, parametro misurato o caratteristiche di uno stato o condizione patologico/a.

Come utilizzato nel presente documento, il termine “dose” si riferisce alla quantità di polipeptide di fusione dell'invenzione somministrata a un soggetto tutta in una volta (dose unitaria), o in due o più somministrazioni nel corso di un intervallo di tempo definito. Per esempio, la dose può fare riferimento alla quantità di polipeptide di fusione somministrata a un soggetto nel corso di un giorno (24 ore) (dose giornaliera), due giorni, una settimana, due settimane, tre settimane o uno o più mesi (per esempio mediante una singola somministrazione, o mediante due o più somministrazioni). L'intervallo tra dosi può essere qualsiasi quantità di tempo desiderata.

L'espressione, “emivita” si riferisce al tempo impiegato dalla concentrazione di siero del polipeptide di fusione per ridursi del 50%, *in vivo*, per esempio a causa di degradazione del ligando e/o clearance o sequestro del ligando doppio-specifico mediante meccanismi naturali. L'emivita di un polipeptide di fusione è aumentata se la presenza in una

matrice biologica (sangue, siero, plasma, tessuto) persiste, *in vivo*, per un periodo più lungo rispetto a un controllo appropriato. L'emivita può essere aumentata del 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o più rispetto a un controllo appropriato.

Sequenze simili od omologhe (per esempio almeno circa il 70% di identità di sequenza) alle sequenze divulgate nel presente documento sono anche parte dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, l'identità di sequenza a livello amminoacidico può essere circa l'80%, l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99% o più. A livello di acido nucleico, l'identità di sequenza può essere circa il 70%, il 75%, l'80%, l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99% o più. In alternativa, l'identità sostanziale esiste quando i segmenti di acido nucleico ibrideranno in condizioni di ibridazione selettive (per esempio condizioni di ibridazione di stringenza molto alta), al complemento del filamento. Gli acidi nucleici possono essere presenti in cellule intere, in un lisato cellulare, o in una forma parzialmente purificata o sostanzialmente pura.

I calcoli di "omologia" o "identità di sequenza" o "similarità" tra due sequenze (i termini sono utilizzati in modo intercambiabile nel presente documento) sono eseguiti come segue. Le sequenze vengono allineate ai fini di un confronto ottimale (per esempio, possono essere introdotti gap in una o in entrambe una prima e una seconda sequenza amminoacidica o di acido nucleico per un allineamento ottimale e le

sequenze non omologhe possono essere ignorate ai fini del confronto). In una forma di realizzazione preferita, la lunghezza di una sequenza di riferimento allineata a scopo di confronto è almeno il 30%, preferibilmente almeno il 40%, più preferibilmente almeno il 50%, ancor più preferibilmente almeno il 60%, e ancor più preferibilmente almeno il 70%, l'80%, il 90%, il 100% della lunghezza della sequenza di riferimento. Successivamente, i residui amminoacidici o i nucleotidi nelle corrispondenti posizioni amminoacidiche o posizioni nucleotidiche vengono confrontati. Quando una posizione nella prima sequenza è occupata dallo stesso residuo amminoacidico o nucleotide della posizione corrispondente nella seconda sequenza, allora le molecole sono identiche in quella posizione (come utilizzato nel presente documento "omologia" amminoacidica o dell'acido nucleico è equivalente a "identità" amminoacidica o dell'acido nucleico). L'identità percentuale tra le due sequenze è in funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze, considerando il numero di gap, e la lunghezza di ciascun gap, che devono essere introdotti per un allineamento ottimale delle due sequenze. Nel caso di proteine correlate circolarmente, la sequenza di uno dei partner deve essere suddivisa e allineata in modo appropriato in due sezioni in modo da ottenere l'allineamento ottimale dei residui funzionalmente equivalenti necessari per calcolare l'identità percentuale.

Gli allineamenti e l'omologia, la similarità o l'identità delle sequenze amminoacidiche e nucleotidiche, come definiti nel presente

documento, sono preferibilmente preparati e determinati utilizzando l'algoritmo BLAST 2 Sequences, utilizzando parametri predefiniti (Tatusova, T. A. et al., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999)). In alternativa, l'algoritmo BLAST (versione 2.0) è impiegato per l'allineamento delle sequenze, con parametri impostati su valori predefiniti. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) è l'algoritmo di ricerca euristica impiegato dai programmi blastp, blastn, blastx, tblastn, e tblastx; questi programmi attribuiscono significatività ai loro risultati utilizzando i metodi statistici di Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2264-8.

Se non diversamente definito, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati nel presente documento hanno lo stesso significato comunemente inteso da un comune tecnico del ramo (per esempio in coltura cellulare, genetica molecolare, chimica degli acidi nucleici, tecniche di ibridazione e biochimica). Tecniche standard sono utilizzate per metodi molecolari, genetici e biochimici (vedere generalmente, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. e Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc.) e metodi clinici.

Permutazione circolare di un ligando di riferimento

La permutazione circolare è funzionalmente equivalente a prendere una molecola a catena lineare, fondere le estremità in modo da formare una molecola circolare e poi tagliare la molecola circolare in

una posizione differente in modo da formare una nuova molecola a catena lineare con terminali differenti. La permutazione circolare ha quindi l'effetto di conservare essenzialmente la sequenza e l'identità degli amminoacidi di una proteina generando al contempo nuovi terminali in posizioni differenti.

Le proteine di fusione ingegnerizzate mirano a combinare le proprietà benefiche di due polipeptidi in una singola proteina, tuttavia, la costruzione della proteina di fusione presenta vari problemi e rischi. Spesso, l'attività funzionale della proteina di fusione è compromessa in relazione a quella della proteina non modificata a causa potenzialmente di un effetto negativo del partner di fusione sull'integrità della struttura terziaria della proteina o sulla capacità delle proteine di legarsi a partner affini (per esempio a causa di ingombro sterico) per indurre la sua funzione biologica. Inoltre, l'inclusione di distanziatori tra i partner di fusione può aumentare il potenziale di suscettibilità alla proteolisi, nel caso di proteine terapeutiche, può aumentare anche il potenziale di immunogenicità; tanto più lungo è il distanziatore, quanto maggiore è il rischio. Quindi, nel generare proteine di fusione, la conservazione dell'integrità strutturale del peptide di fusione, il mantenimento dell'accesso non ostruito per il legame con i partner affini necessari e la riduzione al minimo della lunghezza delle sequenze spaziatriche sono importanti obiettivi di progettazione. Per questi scopi, l'utilizzo di permutazione circolare di un ligando come descritto nel presente documento fornisce posizioni preferenziali per la fusione a una seconda

proteina.

Posizioni preferenziali per i nuovi terminali sono geometricamente, strutturalmente e funzionalmente favorite (rispetto ai terminali nativi) per la fusione di un partner di fusione polipeptidico desiderato, e ridurre la lunghezza del distanziatore necessario. In una forma di realizzazione, la posizione dei nuovi terminali è più prossimale alla posizione nativa di un potenziale partner di fusione con cui il ligando si associa normalmente durante la formazione per gradi di un complesso di attivazione del recettore cellulare. L'orientamento del ligando modificato e del partner di fusione nel polipeptide di fusione può essere ottimale per potenziare l'attività agonistica del ligando nei confronti del complesso di attivazione del recettore, o fornire ingombro sterico della formazione per gradi del complesso di attivazione fornendo pertanto antagonismo del complesso di attivazione.

Il processo della permutazione circolare per l'IL6 è illustrato schematicamente in FIG. 2. I residui amminoacidici costituenti della proteina IL6 nativa sono numerati in sequenza da 47 fino a 212 dal terminale ammino al terminale carbossile.

Per permutare circolarmente IL6, costrutti ricombinanti sono ingegnerizzati in maniera tale che i terminali ammino e carbossi nativi di IL6 siano uniti da una sequenza linker, e i nuovi terminali ammino e carbossi siano ingegnerizzati rispettivamente in corrispondenza dei residui amminoacidici 182 e 180. (figura 2). Quindi, la permutazione circolare produce una nuova proteina lineare (IL-6 (182/180), anche

nota come Picasso3) che, procedendo dal terminale ammino al terminale carbossi, comprende il segmento della proteina originale corrispondente ai residui da 182 fino a 212 (ora da 1 fino a 31) seguito dal linker, seguito da un segmento della proteina originale corrispondente ai residui da 49 fino a 180 (ora da 39 fino a 107) (FIG. 2).

È importante creare una permutazione di un ligando nativo che conserverà l'attività biologica della forma nativa del ligando fornendo al contempo un terminale ottimale per fondere un partner di fusione polipeptidico desiderato. Se i nuovi terminali interrompono una regione critica della proteina nativa, l'attività può andare persa. Analogamente, se il collegamento dei terminali originali distrugge l'attività, nessuna permutazione conserverà l'attività biologica. Quindi, ci sono due requisiti per la creazione di una proteina attiva permutata circolarmente: 1) i terminali nella proteina nativa devono essere posizionati favorevolmente in modo che la creazione di un legame non distrugga l'attività biologica; e 2) deve esistere un "sito di apertura" dove nuovi terminali possono essere formati senza interrompere una regione critica per il ripiegamento delle proteine e l'attività biologica desiderata.

Il nuovo N-terminale e il nuovo C-terminale del ligando modificato non possono interrompere alcun dominio di legame del ligando modificato per il recettore bersaglio.

I ligandi modificati possono essere completamente attivi quanto i ligandi originali. I ligandi modificati possono avere una attività

intensificata rispetto ai ligandi originali. L'attività potenziata può essere affinità di legame aumentata per il recettore bersaglio.

Quindi, in generale, buoni candidati per la permutazione circolare sono proteine in cui i terminali della proteina originale sono in stretta prossimità e orientati favorevolmente. I terminali della proteina originale possono essere a una distanza uguale a o inferiore a 20 Å. Laddove i terminali sono situati naturalmente ravvicinati, si prevede che la fusione diretta dei terminali l'uno rispetto all'altro è possibile e l'introduzione di un linker avrà relativamente poco effetto. Tuttavia, poiché il linker può essere di qualsiasi lunghezza, la stretta prossimità dei terminali nativi non è un requisito assoluto.

È desiderabile utilizzare una sequenza linker nella proteina permutata che conservi la distanza tra i terminali ammino e carbossi che sia paragonabile alla distanza tra i terminali ammino e carbossi presenti nella molecola non permutata o nativa. La sequenza linker di per sé può essere da almeno circa un amminoacido ad almeno circa 10 amminoacidi. Un numero esiguo di amminoacidi da qualsiasi terminale può essere rimosso (tagliato) in modo da portare i terminali vicini tra di loro. Per esempio, nel complesso cristallino di IL-6 con IL-6R e gp130, i terminali della citochina IL6 sono a una distanza di 16 Å (Brevnova et al. (2003) Science 300:2102). La rimozione dei primi due residui N-terminali, che non sono richiesti strutturalmente o funzionalmente, riduce la distanza tra i terminali a 10,2 Å. Un collegamento che essenzialmente preserva questa spaziatura è realizzato con la

sequenza peptidica SGGSGGG (SEQ ID NO: 14). In maniera simile, un connettore preferito per IL-1 β e IL-2 permutati circolarmente sono GGSGGSG e GG, rispettivamente (SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16, rispettivamente).

La selezione di un sito di apertura può essere determinata da un certo numero di fattori. Laddove la conformazione tridimensionale della proteina sia nota o predetta, siti di apertura preferiti saranno posizionati nelle anse o regioni di collegamento che non mostrano una struttura tridimensionale altamente regolare. Quindi, è preferibile che i siti di apertura siano selezionati in regioni della proteina che non contengono strutture secondarie definite come eliche alfa, filamenti β e simili. Metodi per identificare regioni di struttura secondaria definita in base alla sequenza amminoacidica sono ampiamente disponibili su Internet. Inoltre, vari programmi sono disponibili per prevedere la struttura tridimensionale delle proteine, recensiti di recente in Nayeem et al., *Protein Science*, 808-24 (2006).

Quando il trattenimento o il miglioramento della bioattività della molecola nativa è desiderato nella molecola permutata circolarmente, è preferibile che il sito di apertura non sia coinvolto direttamente o indirettamente nelle interazioni con i suoi partner proteici. La scelta del nuovo sito di apertura preferibilmente non interrompe un dominio di legame presente nel ligando nativo che è coinvolto direttamente o indirettamente nell'affinità di legame del ligando nativo per il suo recettore bersaglio.

In alternativa, laddove la sostituzione di determinati amminoacidi o la modifica delle catene laterali di determinati amminoacidi non cambi l'attività di una proteina, si prevede che questi amminoacidi non siano critici per l'attività della proteina. Quindi, gli amminoacidi che possono essere mutati (*in vitro*) o che sono attualmente modificati *in vivo*, con poco impatto sull'attività della proteina, sono candidati potenzialmente buoni per i siti di apertura. I siti di apertura preferiti in IL-6 sono tra i residui 131 e 135 e tra i residui 180 e 182. Un sito di apertura preferito in IL-1 β è tra i residui 179 e 180, e anche tra i residui 223 e 224. Un sito di apertura preferito in IL-2 è tra i residui 94 e 95.

Laddove la proteina è un membro di una famiglia di proteine correlate all'interno di una specie, è possibile dedurre che le sequenze altamente conservate sono critiche per l'attività biologica, mentre le regioni variabili non lo sono. Analogamente, è possibile dedurre che le sequenze altamente conservate di una proteina che è funzionalmente conservata tra specie di mammiferi, in particolare se c'è attività farmacologica tra specie, sono critiche per l'attività biologica. I siti di apertura sono spesso selezionati in regioni della proteina che non mostrano identità di sequenze altamente conservate tra i vari membri della famiglia delle proteine, all'interno o tra specie. In alternativa, siti di apertura preferiti che sono identificati in una proteina forniscono buone posizioni candidate per i siti di apertura in proteine omologhe. Metodi per determinare l'identità di sequenza sono ben noti ai tecnici del ramo

e sono descritti sopra.

Un tecnico del ramo riconoscerà che altre modifiche possono essere apportate. Quindi per esempio, possono essere apportate sostituzioni amminoacidiche che aumentano la specificità o l'affinità di legame del ligando modificato mediante permutazione circolare. Quindi laddove ci sono regioni del ligando che non sono di per sé coinvolte nell'attività del ligando, queste regioni possono essere eliminate o sostituite con segmenti più corti che servono meramente a mantenere le relazioni speciali corrette tra il ligando e le proteine a cui è destinato ad associarsi.

Per un certo numero di ligandi nativi (per esempio fattori di crescita, citochine e altre proteine), i terminali carbossi e ammino sono situati in modo che, in seguito alla formazione dei polipeptidi di fusione mediante unione di un secondo polipeptide o molecola a uno dei terminali del ligando nativo, l'attività a valle desiderata del secondo polipeptide sia notevolmente ridotta o assente. Il ripiegamento aberrante delle proteine o l'ingombro sterico è spesso ascritto in modo da tenere conto dell'attività ridotta o assente del secondo polipeptide. In altri casi, la fusione di un secondo polipeptide a un terminale della proteina nativa è tollerata (ovvero l'attività funzionale della proteina nativa non è notevolmente influenzata), tuttavia l'orientamento del polipeptide di fusione non impartisce l'attività desiderata alla proteina di fusione, come nel caso in cui il polipeptide di fusione è inteso interferire (ovvero antagonizzare) con la formazione di un complesso di

trasmissione del segnale attraverso l'interferenza sterica laddove la posizione del polipeptide di fusione occupa lo spazio che una molecola di trasmissione del segnale a valle occuperebbe nell'assemblaggio del complesso di trasmissione del segnale attivo.

Al contrario, la permutazione circolare di un ligando come descritto qui fornisce un mezzo mediante il quale il ligando può essere alterato in modo da produrre nuovi terminali carbossi e ammino che permettono la fusione della seconda molecola o polipeptide senza diminuire la specificità e l'affinità di legame del ligando alterato rispetto alla sua forma nativa, e che permette anche alla seconda molecola fusa o polipeptide di impartire, per esempio, superagonismo o antagonismo di un complesso di attivazione di trasmissione del segnale. Il polipeptide di fusione può convertire un ligando nativo che è un agonista di un complesso di attivazione di trasmissione del segnale bersaglio in un antagonista del complesso di attivazione di trasmissione del segnale. Questo è illustrato nel contesto della citochina, IL-6, in Figg. 1-5.

I polipeptidi di fusione costituiti da un ligando permutato circolarmente fuso a un partner di fusione, possono potenziare l'affinità di legame del polipeptide di fusione con il recettore nativo del ligando nativo rispetto all'affinità di legame del ligando nativo (non fuso, non modificato, non permutato) con il suo recettore nativo. Per esempio, l'Esempio 3 mette a confronto l'affinità di legame rispetto al recettore di IL6 di, 1) un polipeptide di fusione costituito da IL6 permutata circolarmente fusa al dominio di una delle molecole di trasmissione del

segnale transmembrana gp130, con 2) IL-6 nativa. L'affinità di legame del polipeptide di fusione risulta essere più di 200 volte superiore all'affinità di legame di IL6 nativa rispetto al recettore di IL6 (Figg. 6A e 6C).

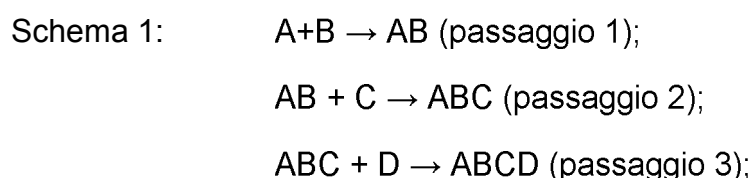
Polipeptidi di fusione

Nel presente documento sono divulgati nuovi polipeptidi di fusione comprendenti ligandi permutati circolarmente (modificati) e almeno un partner di fusione polipeptidico, in cui il polipeptide di fusione possiede in via opzionale specificità e affinità di legame superiori rispetto alla specificità e all'affinità di legame del ligando nativo (non permutato) con il suo recettore bersaglio nativo. In aggiunta, il polipeptide di fusione può per esempio, essere ulteriormente ingegnerizzato in modo da generare un antagonista di una via in cui il ligando nativo funzionava come un agonista attraverso il legame di un recettore bersaglio come descritto nel presente documento.

Molti recettori legano ligandi nativi e si aggregano, ovvero formano dimeri, trimeri o multimeri, in seguito al legame dei loro ligandi nativi (recettore dimerico o multimerico). Per esempio, le citochine della famiglia di IL-1, i fattori di crescita dei fibroblasti e le citochine a 4 eliche formano complessi di trasmissione del segnale multimerici di incorporazione di vari numeri di ligandi e recettori (FIG. 9). L'aggregazione indotta da ligandi (per esempio dimerizzazione, multimerizzazione) porta spesso a complessi di affinità superiore e avvia la trasduzione del segnale. Di conseguenza, i polipeptidi di

fusione possono, per esempio, antagonizzare la trasmissione del segnale mediante, per esempio, l'inibizione del legame del ligando nativo, o l'inibizione dell'aggregazione dei recettori (per esempio dimerizzazione, trimerizzazione, multimerizzazione) con o senza anche l'inibizione del legame del ligando nativo (FIG. 10). In alternativa, i polipeptidi di fusione possono potenziare la trasmissione del segnale mediante, per esempio, la facilitazione della progressione dell'aggregazione, attraverso la generazione di ligandi con maggiore affinità per i recettori bersaglio o la pre-associazione di componenti che portano a un complesso di trasmissione del segnale. I polipeptidi di fusione possono legare un ligando o recettore monomero, o un complesso dimerico, o multimerico e possono inibire o potenziare una o più fasi nell'assemblaggio di complessi di trasmissione del segnale e pertanto inibire o potenziare la trasduzione del segnale di una via cellulare.

Per esempio, nell'accumulo per gradi di complessi di ordine superiore che portano a un complesso attivo finale come esposto nello Schema 1, che è rappresentativo della via che porta alla trasmissione del segnale mediante IL-2 dove IL-2 è "A", IL-2R α è "B", IL-2R β è "C" e yc è "D":



dove ABCD è il complesso di trasmissione del segnale e la

trasmissione del segnale è avviata portando C e D l'uno vicino all'altro. (Il complesso di trasmissione del segnale è illustrato in FIG. 9 e la struttura dei componenti extracellulari del complesso è in FIG. 8).

Ci si aspetterebbe che una catena singola pre-assemblata "AB" sia un superagonista in quanto possederebbe una più alta affinità con C rispetto ad A o B e quindi faciliterebbe l'assemblaggio di ABCD a concentrazioni inferiori. Nel caso in cui i terminali nativi di "A" non siano posizionati in modo da attivare la proteina di fusione, una proteina di fusione del ligando "A" che è stata modificata mediante permutazione circolare in conformità all'invenzione in modo da essere orientata in modo ottimale per essere fusa con "B" consente la generazione della proteina "AB" a catena singola. La Figura 8 illustra questo per il caso di un superagonista di IL-2 ingegnerizzato (RDB1405; SEQ ID NO: 12 (proteina) e SEQ ID NO: 13 (DNA)). Sulle cellule T attivate, IL-2 segnala attraverso il complesso quaternario di "alta affinità" costituito da IL-2, IL-2R α (chiamato anche CD25), IL-2R β e γ c (FIG. 8A). Sebbene IL-2 possa legarsi molto più debolmente a IL-2R β in assenza di IL-2R α , il legame di IL-2R α a IL-2 stabilizza la conformazione di IL-2 per la presentazione a IL-2R β con un'affinità molto superiore. γ c è poi reclutata sulla superficie composita formata dal complesso IL-2/IL-2R β . L'espressione di una proteina di fusione di IL-2 nativa con IL-2R α è problematica perché i terminali di IL-2 sono in corrispondenza della faccia polare opposta con cui IL-2R α interagisce, richiedendo un distanziatore in modo da occupare più di 50 angstrom e interrompendo

probabilmente la capacità di legame della proteina di fusione (FIG. 8A, i terminali di IL-2 sono sulla parte bassa che punta lontano da IL-2R α sulla parte alta). Di fatto, una proteina di fusione IL-2/IL-2R α con un distanziatore lungo è stata descritta di recente, e non è in grado di promuovere un segnale in assenza di un clivaggio mediato da proteasi del linker con rilascio successivo di IL-2 (Puskas et al., Immunology, 133(2), 206-220 (2011)). I terminali di IL-2(95/94) permutati circolarmente sono ingegnerizzati in modo da essere sulla faccia prossimale all'interfaccia di legame con IL-2R α , riducendo notevolmente la lunghezza del distanziatore necessario per generare una proteina di fusione che possa assemblarsi come complesso attivato e possa funzionare da super agonista (FIG. 8B). (La distanza tra il C-terminale ingegnerizzato dell'IL-2 permutata circolarmente e l'N-terminale di IL-2R α è di circa 11 angstrom; il costrutto di fusione progettato, RDB1405 contiene un distanziatore da 6 amminoacidi tra IL-2 e IL-2R α).

In alternativa, l'accumulo per gradi di complessi di attivazione multimerici per la trasduzione del segnale offre l'opportunità di creare potenti antagonisti. In questo caso, il ligando è modificato mediante permutazione circolare in modo da fornire un N- o C-terminale che facilita il collegamento di un partner di fusione in un orientamento che ostacola stericamente la formazione per gradi di un complesso di attivazione multimerico di un recettore bersaglio, e in alcuni casi il partner di fusione può aumentare ulteriormente l'affinità di legame con il

recettore bersaglio, se per esempio, il partner di fusione è una proteina o dominio che contiene di per sé determinanti di legame al recettore bersaglio. Questo ultimo caso è illustrato nel contesto della citochina, IL-6, in Figg. 1-5 e 10. In questo esempio, il polipeptide di fusione comprende interleuchina 6 (IL-6) permutata circolarmente fusa a un polipeptide comprendente il dominio D1 del recettore transmembrana gp130, che è un componente naturale del complesso di trasmissione del segnale di IL-6 esamerico. Il ligando permutato circolarmente (RDB1503) (FIG. 2), in assenza di un partner di fusione, mantiene l'attività agonistica identica all'IL-6 di tipo selvatico (FIG. 4), e quindi mantiene le interazioni necessarie con IL-6R α e gp130. Il complesso di trasmissione del segnale esamerico di IL-6 è composto da 2 molecole ciascuno di IL-6, IL-6R α e gp130 (FIG. 1). Il segnale è avviato attraverso il dominio citoplasmico delle due molecole di gp130 quando due eterotrimeri (ciascuno con una molecola ciascuno di IL-6, IL-6R α , e gp130) si uniscono (FIG. 1). La forza motrice per la fase finale nella formazione del complesso è data dalle interazioni simmetriche tra i domini D1 di gp130 da un eterotrimerico con IL-6 e IL-6R α dell'altro eterotrimerico. Una fusione del dominio D1 di gp130 a IL-6 nativa orienta il dominio D1 lontano dall'interfaccia di gp130 (FIG. 3A) e determina una proteina (RDB1529) che non antagonizza la trasmissione del segnale mediata da IL-6 (FIG. 5). Al contrario, una fusione del dominio D1 all'IL-6 permutata circolarmente (RDB1527) orienta D1 in modo che possa interagire con IL-6R α in una maniera analoga al complesso

esamerico, e cosa più importante previene stericamente il legame del dominio D1 da un secondo eterotrimerico (FIG. 3B), e quindi è un potente antagonista della trasmissione del segnale mediata da IL-6 (FIG. 5). Dal momento che la proteina di fusione CP_IL-6_D1 ora trasporta i determinanti di legame di IL-6R α combinati dell'IL-6 non modificata e il dominio gp130-D1 nativo in un singolo polipeptide, l'affinità di legame del polipeptide di fusione è misurato per essere di 40 pM, più di 200 volte superiore all'affinità di legame dell'IL6 nativa rispetto all'IL-6R α (Figg. 6A e 6C).

Nel presente documento sono divulgati polipeptidi di fusione comprendenti il ligando modificato e un primo partner di fusione in cui il primo partner di fusione del ligando modificato è derivato da tutta o una porzione di una proteina con determinanti di legame aggiuntivi rispetto al recettore bersaglio, per esempio come nel caso di una proteina o dominio che è un componente del complesso di trasmissione del segnale multimerico naturale e il primo partner di fusione previene stericamente l'assemblaggio del complesso completo di trasmissione del segnale, agendo pertanto come un antagonista.

I ligandi modificati dalla permutazione circolare comprendenti i polipeptidi di fusione includono proteine solubili i cui legami ai recettori della superficie cellulare avviano una cascata di trasmissione del segnale o fungono da regolatori negativi naturali di una cascata di trasmissione del segnale (per esempio antagonisti), inclusi, ma non in via limitativa, citochine, chemochine, adipochine, fattori di crescita,

ormoni, recettori solubili, proteine che legano citochine (per esempio IL-18bp).

Ligandi e proteine preferite modificate mediante permutazione circolare comprendenti polipeptidi di fusione includono proteine a fascio di eliche e citochine (inclusi, ma non in via limitativa, ormone della crescita, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-22, IL-23p19, IL-11, IL-13, IL-15, IL-12p35, IL-21, IL-30 (IL27p28), IL-34, IL-35, IL-35p35, IFN- β , IFN γ , LIF, CNTF, Oncostatina M, CLCF-1, GCSF, GM-CSF, EPO, ferritina, leptina, lattogeno placentare, prolattina, apolipoproteina e), proteine b-trifoglio (incluse, ma non in via limitativa, IL-1 α , IL-1 β , IL-IRa, IL18, IL-33, IL-36Ra, IL-36a, IL-36b, IL-36g, IL-37, IL-38, IL1Hy2, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8a, FGF-8b, FGF-8e, FGF-8f, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-22, FGF-23), proteine cilindro α/β (TIM) (incluse, ma non in via limitativa, isomerasi triosefosfato), proteine sandwich beta (incluse, ma non in via limitativa, galectina-1, galectina-3, TNF-beta, sette proteine β -elica, dominio MHC $\alpha1\alpha2$ classe 1, dominio I integrina, dominio GYF, dominio C1, dominio C2 (per esempio, da cPLA2, PKC, sinaptotagmina), domini PDZ, C3d, C5a.

Il ligando modificato mediante permutazione circolare comprendente i polipeptidi di fusione è selezionato più preferibilmente da IL-6, IL-2, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-IRa, IL-18, FGF-19, FGF-21, FGF-23.

I ligandi modificati mediante permutazione circolare comprendenti i polipeptidi di fusione possono avere specificità di legame per un recettore, o per un recettore che lega un ligando nativo nell'elenco seguente: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, recettore di EGF, ENA-78, Eotassina, Eotassina-2, Exodus-2, FGF-acido, FGF-basico, fattore di crescita dei fibroblasti-10, ligando FLT3, Fractalchina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inibina α , Inibina β , IP-10, fattore di crescita dei cheratinociti-2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotattina, sostanza inibitoria Mulleriana, fattore inibitorio della colonia di monociti, proteina attrattiva per monociti, M-CSF, MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, fattore inibitore di progenitori mieloidi-1 (MPlF-1), NAP-2, Neurturina, fattore di crescita nervoso, β -NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, fattore di cellule staminali (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, fattore di necrosi tumorale (TNF), TNF- α , TNF- β , recettore di TNF I, recettore di TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, recettore di VEGF 1, recettore di VEGF 2, recettore di VEGF 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER1, HER2, HER3 e HER4.

Recettori aggiuntivi per cui il ligando modificato può avere specificità di legame includono i recettori nell'elenco seguente o un

recettore che lega un ligando nativo incluso nell'elenco seguente: EpoR, sito di riconoscimento di TACE, TNF BP-I, TNF BP-II, IL-1R1, IL-6R, IL-10R, IL-18R, IL-1, IL-19, IL-20, IL-21, IL-23, IL-24, IL-25, IL-27, IFN- γ , IFN- α/β , CD4, CD89, CD19, HLA-DR, CD38, CD138, CD33, CD56, CEA e recettore di VEGF.

Ulteriori recettori per cui i ligandi modificati dei polipeptidi di fusione possono avere specificità di legame includono recettore di peptide di rilascio della gastrina, recettore della neurotensina, recettore dell'adrenomedullina, recettore di istamina H₂, recettore di HCG, recettore di MET, recettore di sfingosina 1-fosfato, CD126, CD213a1, e KDR, tra gli altri.

Il ligando modificato della proteina di fusione polipeptidica può avere specificità di legame per un recettore che dimerizza in seguito al legame a un ligando nativo (un recettore dimerico), o un recettore che forma multimeri, come trimeri, in seguito al legame a un ligando nativo (un recettore multimerico). Molti recettori di citochine e recettori del fattore di crescita, come membri della superfamiglia dei recettori di TNF (per esempio TNFR1, TNFR2) e membri della famiglia del recettore tirosin chinasi (per esempio EGFR, PDGFR, recettore di M-CSF (c-Fms)) formano dimeri o multimeri in seguito al legame con i loro ligandi nativi. La superfamiglia di recettori di TNF è un gruppo di proteine riconosciuto nell'arte che include TNFR1 (p55, CD120a, p60, membro della superfamiglia di recettori di TNF 1A, TNFRSF1A), TNFR2 (p75, p80, CD120b, membro della superfamiglia di recettori di TNF 1B,

TNFRSF1B), CD (TNFRSF3, LT β R, TNFR2-RP, TNFR-RP, TNFCR, TNF-R-III), OX40 (TNFRSF4, ACT35, TXGP1L), CD40 (TNFRSF5, p50, Bp50), Fas (CD95, TNFRSF6, APO-1, APTI), DcR3 (TNFRSF6B), CD27 (TNFRSF7, Tp55, S152), CD30 (TNFRSF8, Ki-1, D1S166E), CD137 (TNFRSF9, 4-1BB, ILA), TRAILR-1 (TNFRSF10A, DR4, Apo2), TRAIL-R2 (TNFRSF10B, DR5, KILLER, TRICK2A, TRICKB), TRAILR3 (TNFRSF10C, DcR1, LIT, TRID), TRAILR4 (TNFRSF10D, DcR2, TRUNDD), RANK (TNFRSF11A), OPG (TNFRSF11B, OCIF, TR1), DR3 (TNFRSF12, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3), DR3L (TNFRSF12L), TAC1 (TNFRSF13B), BAFFR (TNFRSF13C), HVEM (TNFRSF14, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA), NGFR (TNFRSF16), BCMA (TNFRSF17, BCM), AITR (TNFRSF18, GITR), TNFRSF19, FLJ14993 (TNFRSF19L, RELT), DR6 (TNFRSF21), SOBa (TNFRSF22, Tnfrh2, 2810028K06Rik) e mSOB (TNFRSF23, Tnfrh1). La famiglia del recettore tirosin chinasi è un gruppo di proteine riconosciuto nell'arte che include EGFR (ERBB1, HER1), PDGFR, c-Fms, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, recettore di insulina e recettori di fattore di crescita insulino-simile (IGF1R, IGF2R). Vedere, Grassot et al., Nucleic Acids Research, 31(1):353-358 (2003).

Il primo partner di fusione polipeptidico può comprendere tutti o una porzione dei domini extracellulari dei recettori naturali o proteine accessorie per l'ormone della crescita, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-22, IL-23, IL-30 (IL27p28), IL-34, IL-35, IFN- β , IFN γ , LIF, CNTF, Oncostatina M, CLCF-1, GCSF, GM-CSF,

EPO, lattogeno placentare, prolattina, apolipoproteina, IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL18, IL-33, IL-36Ra, IL-36a, IL-36b, IL-36g, IL-37, IL1Hy2, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8a, FGF-8b, FGF-8e, FGF-8f, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-22, FGF-23, TNF-beta.

Il partner di fusione è preferibilmente il dominio extracellulare o un dominio dello stesso selezionato da gp130 (più preferibilmente il dominio D1), IL-2R α , IL-15R α , IL-1RI, IL-1RII, IL-18R α , IL-18R β , IL1RAcP, FGFR1b, FGFR1c, FGFR2b, FGFR2c, FGFR3b, FGFR3c, FGFR4, α -Klotho e β -Klotho.

La proteina modificata mediante permutazione circolare comprendente i polipeptidi di fusione e il partner di fusione possono originare dalla stessa proteina originale da cui la fusione genera un "omodimero" a catena singola.

Il partner di fusione del polipeptide permutato circolarmente può anche richiedere la permutazione circolare per consentire la fusione. Quindi entrambi i partner della proteina di fusione dell'invenzione possono essere permutati circolarmente, se necessario.

Il partner di fusione del polipeptide può fornire altre funzioni o comportamento nuove(o) o migliorate(o)/potenziate(o) al polipeptide di fusione. In aggiunta a, o in alternativa, un secondo partner di fusione può essere aggiunto al polipeptide di fusione dell'invenzione per fornire altre funzioni o comportamento nuove(o) e migliorate(o)/potenziate(o) al

polipeptide di fusione dell'invenzione. Per esempio, i partner di fusione possono fornire emivita prolungata al polipeptide di fusione dell'invenzione. L'aggiunta di partner di fusione all'emivita *in vivo* estesa è particolarmente utile quanto il polipeptide di fusione dell'invenzione è di una dimensione che è rapidamente liberata dal corpo, che può limitare l'uso clinico.

Un polipeptide dell'invenzione può essere modificato in modo che esso abbia una dimensione idrodinamica maggiore mediante per esempio, accoppiamento a polimeri o carboidrati (come polietilenglicole (PEG), acido colominico o idrossietil amido), integrazione dei siti di N-glicosilazione o attraverso analoghi PEG ricombinanti prodotti attraverso la fusione di una lunga sequenza polipeptidica flessibile, come quelli descritti in U.S. 2010/0239554 A1, La dimensione idrodinamica di una proteina di fusione polipeptidica dell'invenzione può essere determinata utilizzando metodi che sono ben noti nell'arte. Per esempio, la cromatografia per gel filtrazione può essere utilizzata per determinare la dimensione idrodinamica. Matrici di gel filtrazione adeguate per la determinazione delle dimensioni idrodinamiche dei ligandi, come matrici di agarosio reticolate, sono ben note e prontamente disponibili.

In una forma di realizzazione preferita, un polipeptide di fusione dell'invenzione è progettato in modo da incorporare un polipeptide del dominio delle mucine come descritto in USSN 61/657,264 dal titolo "Fusion Polypeptides Comprising an Active Protein Linked to a Mucin-

Domain Polypeptide” depositato nella medesima data del presente documento, recante il numero di protocollo 4000.3058 US.

In una forma di realizzazione, un polipeptide di fusione dell'invenzione può essere fuso a proteine, domini proteici o peptidi che potenziano l'emivita sierica attraverso il riciclaggio mediato da FcRn, incluse immunoglobuline, il dominio Fc delle immunoglobuline (più in particolare IgG1 e IgG2), albumina sierica, domini di albumina sierica (più in particolare DIII), peptidi con affinità di legame a FcRn, o proteine o peptidi con affinità di legame alle immunoglobuline o albumina sierica (come nanobody).

Metodi per l'analisi farmacocinetica e la determinazione dell'emivita del ligando saranno familiari ai tecnici del ramo. Dettagli possono essere trovati in Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists e in Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). Viene anche fatto un riferimento in “Pharmacokinetics”, M Gibaldi & D Perron, pubblicato da Marcel Dekker, 2a Rev. ex edizione (1982), che descrive i parametri farmacocinetici come le emivite di t alfa e t beta e l'area sotto la curva (AUC).

In una forma di realizzazione, un polipeptide di fusione dell'invenzione può essere fuso a proteine, domini proteici o peptidi che bersagliano (ovvero hanno affinità per) specifici organi, tessuti, cellule o matrici fisiologiche (come collagene), carboidrati, o lipidi come un mezzo per localizzare, distribuire o trattenere il polipeptide di fusione

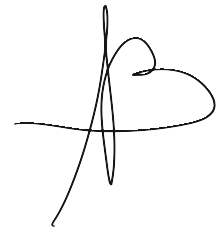
dell'invenzione in una regione particolare del corpo.

È possibile includere anche sequenze aggiuntive nell'ambito del polipeptide di fusione come sequenze tag di affinità che possono essere fornite per facilitare la purificazione o l'isolamento del polipeptide di fusione come quelli noti nell'arte. Le sequenze di stabilità possono anche essere aggiunte al polipeptide di fusione per proteggere la molecola dalla degradazione (per esempio mediante una proteasi). Sequenze di stabilità adeguate includono, ma non sono limitate a, molecole di glicina incorporate dopo la metionina di inizio (ad esempio, MG (SEQ ID NO: 17), o MGG (SEQ ID NO: 18) per proteggere la molecola di fusione dall'ubiquitinazione; due proline incorporate al C-terminale (che conferiscono protezione contro l'azione della carbossipeptidasi) e simili.

Al fine di testare l'attività biologica, la specificità di legame e l'affinità di legame di un polipeptide di fusione dell'invenzione, può essere utilizzato un saggio biologico appropriato. Saggi per attività biologiche di vari tipi sono ben noti ai tecnici del ramo. Il saggio particolare dipende dall'attività particolare della molecola.

Preparazione di proteine permutate circolarmente

Le proteine permutate circolarmente possono essere realizzate mediante un certo numero di mezzi noti ai tecnici del ramo. Questi includono sintesi chimica, modifica di proteine esistenti ed espressione di proteine permutate circolarmente utilizzando metodologia di DNA ricombinante.



Laddove la proteina è relativamente corta (ovvero meno di circa 50 amminoacidi) la proteina permutata circolarmente può essere sintetizzata utilizzando tecniche di sintesi peptidica chimica standard. Se il linker è un peptide, esso può essere incorporato durante la sintesi. Se il linker non è un peptide, esso può essere accoppiato al peptide dopo la sintesi. La sintesi in fase solida in cui l'amminoacido del C-terminale della sequenza è attaccato a un supporto insolubile seguito da aggiunta sequenziale degli amminoacidi restanti nella sequenza è il metodo preferito per la sintesi chimica dei ligandi permutati circolarmente e delle proteine di fusione di questa invenzione. Tecniche per la sintesi in fase solida sono descritte da Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. volume 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A., Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963), e Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2a ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

In alternativa, la proteina permutata circolarmente può essere realizzata modificando chimicamente una proteina nativa. In generale, questo richiede la reazione della proteina nativa in presenza del linker in modo da formare legami covalenti tra il linker e i terminali carbossile e ammino della proteina, formando così una proteina circolare. Nuovi terminali sono poi formati mediante apertura del ponte peptidico che unisce amminoacidi in un'altra posizione. Questo può essere effettuato chimicamente o enzimaticamente utilizzando, per esempio, una

peptidasi.

In una forma di realizzazione preferita, la proteina permutata circolarmente, o polipeptidi di fusione comprendenti la proteina permutata circolarmente fusa ad almeno un partner di fusione, sarà sintetizzata utilizzando la metodologia di DNA ricombinante. In generale questo implica la creazione di una sequenza di DNA che codifica il ligando permutato circolarmente (o l'intero polipeptide di fusione contenente il ligando permutato circolarmente e il partner di fusione), posizionando il DNA in un vettore di espressione sotto il controllo di un promotore particolare, esprimendo la proteina in un ospite, isolando la proteina espressa e, se necessario, rinaturando la proteina.

Il DNA che codifica il ligando permutato circolarmente può essere prodotto mediante sintesi genica, o utilizzando metodi di amplificazione di DNA, per esempio reazione a catena della polimerasi (PCR) e reazione a catena della polimerasi di trascrizione inversa (RT-PCR). Il DNA che codifica una sequenza di segnale in modo che la proteina di fusione permutata circolarmente elaborata correttamente sia secreta dalla cellula può essere aggiunto in via opzionale.

Un tecnico del ramo apprezzerà che il ligando permutato circolarmente e l'altra molecola comprendente i polipeptidi di fusione dell'invenzione possano essere uniti insieme secondo qualsiasi ordine. Quindi, la seconda molecola è unita preferibilmente al terminale ammino (fusione N-terminale) o carbossi (fusione C-terminale) del ligando permutato circolarmente.

I ligandi permutati circolarmente e le loro proteine di fusione possono essere espressi in una varietà di cellule ospite, inclusi E. coli, altri ospiti batterici, lievito e varie cellule eucariote superiori come linee cellulari COS, CHO e HeLa e linee cellulari del mieloma. Il gene della proteina ricombinante sarà collegato operativamente ad appropriate sequenze di controllo dell'espressione per ciascun ospite. Per E. coli questo include un promotore come i promotori T7, trp, o lambda, un sito di legame di ribosomi e preferibilmente un segnale di terminazione della trascrizione. Per le cellule eucariote, le sequenze di controllo includeranno un promotore e preferibilmente un potenziatore derivato da geni di immunoglobuline, SV40, citomegalovirus eccetera, e una sequenza di poliadenilazione e possono includere sequenze di donatore e accettore di splicing.

I plasmidi dell'invenzione possono essere trasferiti (trasfettati) nella cellula ospite scelta mediante metodi ben noti come trasformazione di cloruro di calcio per E. coli e trattamento con fosfato di calcio, elettroporazione, trattamento con lipofectamina o trattamento con PEI per cellule di mammifero. Le cellule trasformate mediante i plasmidi possono essere selezionate mediante resistenza a antibiotici conferita ai geni contenuti nei plasmidi, come i geni amp, gpt, neo e hyg.

Una volta espresse, le proteine di fusione ricombinanti possono essere purificate secondo procedure standard dell'arte, inclusa precipitazione di solfato di ammonio, cromatografia di affinità,

cromatografia su colonna con resine ioniche o idrofobe, elettroforesi su gel e simili (vedere, in generale, R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y. (1990)). Composizioni sostanzialmente pure con purezza almeno da circa il 90 al 95% sono preferite, e con purezza dal 98 al 99% o più sono più preferite per gli utilizzi farmaceutici. Una volta purificati, i polipeptidi possono essere testati in modelli preclinici, testati clinicamente o utilizzati terapeutamente.

Un tecnico del ramo riconoscerebbe che è possibile apportare modifiche alla sequenza proteica circolarizzata senza ridurre la sua attività biologica. Alcune modifiche possono essere effettuate in modo da facilitare il clonaggio, l'espressione o l'incorporazione del ligando permutato circolarmente in una proteina di fusione. Tali modifiche sono ben note ai tecnici del ramo e includono, aggiunta di residui per esempio, una metionina aggiunta al terminale ammino per fornire un sito di iniziazione, o amminoacidi aggiuntivi posizionati sul terminale per proteggere la proteina dall'esopeptidasi. Per esempio, IL6 permutata circolarmente può avere in via opzionale un codone di metionina (Met) aggiuntivo in corrispondenza del terminale ammino per fornire un sito di iniziazione per la traduzione.

Un tecnico riconoscerà che altre modifiche possono essere apportate. Quindi, per esempio, possono essere apportate sostituzioni amminoacidiche che aumentano la specificità o l'affinità di legame della

proteina permutata circolarmente eccetera. In alternativa, regioni non essenziali della molecola possono essere accorciate o eliminate interamente. Quindi, laddove ci sono regioni della molecola che non sono di per sé coinvolte nell'attività della molecola, esse possono essere eliminate o sostituite con segmenti più corti che servono meramente a mantenere le relazioni spaziali corrette tra i componenti attivi della molecola.

Le due proteine possono essere fuse insieme direttamente o unite per mezzo di un distanziatore peptidico. Il distanziatore peptidico può essere lungo da circa 1 a 40 residui. In una forma di realizzazione preferita, il distanziatore peptidico è lungo 20 Å o meno.

In generale, il distanziatore non ha di per sé attività biologica e funziona solo per collegare e fornire una certa distanza tra le due proteine attive comprendenti la proteina di fusione. Tuttavia, un tecnico del ramo riconoscerà che i residui del distanziatore possono essere scelti in modo da ottimizzare una proprietà della proteina di fusione. Per esempio, un distanziatore contenente residui polari o carichi nel distanziatore può potenziare la solubilità in soluzioni acquose. Analogamente, i residui del distanziatore possono essere scelti per il loro effetto sul ripiegamento della proteina di fusione.

Resta inteso che l'invenzione include gli acidi nucleici descritti sopra codificanti i polipeptidi di fusione delle invenzioni come acidi nucleici ricombinanti prodotti mediante metodologia di DNA ricombinante, nonché vettori di espressione comprendenti gli acidi

nucleici dell'invenzione e cellule ospite comprendenti i vettori dell'invenzione.

Utilizzi terapeutici

I polipeptidi di fusione dell'invenzione descritti nel presente documento sono adeguati in particolare come agenti terapeutici che bersagliano cellule di interesse *in vivo* (ovvero cellule bersaglio) in quanto essi mostrano, tra le altre proprietà, affinità di legame più alte per i recettori nativi rispetto ai ligandi nativi e attività da super agonista e antagonista. Quindi, le composizioni e le composizioni farmaceutiche contenenti i presenti polipeptidi di fusione possono essere somministrate a un paziente che necessita di trattamenti terapeutici. In applicazioni terapeutiche, i polipeptidi di fusione dell'invenzione comprendenti ligandi permutati circolarmente e varie composizioni contenenti queste molecole sono somministrati a un paziente affetto da una malattia o disturbo in una quantità terapeuticamente efficace.

L'invenzione fornisce composizioni comprendenti polipeptidi di fusione dell'invenzione e un trasportatore farmaceuticamente accettabile, diluente o eccipiente, e metodi terapeutici e diagnostici che impiegano i ligandi o composizioni dell'invenzione.

L'utilizzo terapeutico e profilattico dei ligandi dell'invenzione implica la somministrazione di ligandi secondo l'invenzione a un mammifero ricevente, come un essere umano. I polipeptidi di fusione dell'invenzione si legano preferibilmente a bersagli con alta affinità e/o avidità. Ligandi sostanzialmente puri con omogeneità da almeno il 90 al



95% sono preferiti per la somministrazione a un mammifero, e con omogeneità dal 98 al 99% o più sono più preferiti per utilizzi farmaceutici, in particolare quando il mammifero è un essere umano. Una volta purificati, parzialmente o fino all'omogeneità desiderata, i polipeptidi di fusione dell'invenzione possono essere utilizzati diagnosticamente o terapeutamente (incluso extracorporeamente) o nello sviluppo e l'esecuzione di procedure di saggio, colorazioni immunofluorescenti e simili.

Per esempio, i polipeptidi di fusione della presente invenzione trovano tipicamente utilizzo nella prevenzione, soppressione o trattamento di stati patologici. Per esempio, i polipeptidi di fusione possono essere somministrati per trattare, sopprimere o prevenire una malattia o disturbo causati dall'attività del recettore, o caratterizzati dall'espressione o dalla sovraespressione del recettore, come infiammazione cronica o malattie infiammatorie croniche, malattie cardiovascolari, malattie metaboliche (per esempio obesità, diabete di tipo II, sindrome metabolica), malattie respiratorie (per esempio asma, COPD), malattie oftalmiche (per esempio AMD, glaucoma), disturbi ematopoietici, immunosoppressione, rigetto del trapianto di organi, malattia acuta del trapianto contro l'ospite, malattie ossee e delle cartilagini (osteoporosi, osteoartrite), ipersensibilità allergica, cancro, infezione batterica o virale, disturbi autoimmuni (che includono, ma non in via limitativa, diabete di tipo I, asma, sclerosi multipla, artrite reumatoide, artrite reumatoide giovanile, artrite psoriasica,

spondilartropatia (per esempio spondilite anchilosante), disturbi autoinfiammatori, lupus eritematoso sistemico, malattia infiammatoria intestinale (per esempio malattia di Crohn, colite ulcerosa), miastenia gravis e sindrome di Behcet), psoriasi, endometriosi e adesione addominale (per esempio post intervento chirurgico addominale).

Un'applicazione preferita è, attraverso l'utilizzo di IL-2 permutata circolarmente fusa a IL-2R α che genera un super agonista di IL-2), il trattamento del cancro, o di condizioni autoimmuni come malattia del trapianto contro l'ospite, rigetto del trapianto di organo.

Una IL-6 permutata circolarmente fusa al dominio D1 di gp130 (generando un antagonista molto potente di IL-6) può essere utilizzata nel trattamento di malattie infiammatorie croniche, malattie autoimmuni (incluse, ma non in via limitativa, artrite reumatoide, psoriasi, artrite psoriasica, artrite reumatoide giovanile, malattia di Crohn, malattia infiammatoria intestinale), cancro (incluso mieloma multiplo) e malattia di Castleman. Come descritto negli esempi di riferimento 2 e 3, la proteina di fusione ligando-gp130 permutata in modo circolare (RDB1527) mostra una maggiore affinità di legame specifica per il recettore di IL6 nativo (Figg. 6A vs. 6C) e inibizione di cellule bersaglio (FIG. 5), rispetto ai ligandi nativi. L'aumento di affinità di legame e inibizione della crescita dei polipeptidi di fusione IL6-gp130 permutati circolarmente può consentire a queste proteine di fusione di essere somministrate a dosaggi più bassi rispetto ad altri inibitori di trasmissione del segnale di IL6, pur raggiungendo la stessa efficacia

terapeutica. In alternativa, la somministrazione agli stessi dosaggi determina un'efficacia terapeutica prolungata poiché le proteine di fusione devono essere liberate dalla circolazione a una concentrazione inferiore prima che possano cessare di mostrare efficacia significativa. In aggiunta, l'aumento di efficacia terapeutica non è accompagnato da un aumento di effetti collaterali indesiderati dovuto a legame non specifico e citotossicità.

Una IL-1 permutata circolarmente fusa a un dominio di IL-1RI, IL-1RII, o IL-1RAcP (generando un antagonista molto potente di IL-1) può essere utilizzata nel trattamento di malattie autoinfiammatorie, diabete di tipo I, malattie infiammatorie croniche, malattie autoimmuni (incluse, ma non in via limitativa, artrite reumatoide, psoriasi, artrite psoriasica, artrite reumatoide giovanile, malattia di Crohn, malattia infiammatoria intestinale), cancro, gotta e osteoartrite.

Una IL-15 permutata circolarmente fusa a IL-15 α (generando un super agonista di IL-15) può essere utilizzata nel trattamento di cancro, di condizioni autoimmuni come malattia del trapianto contro l'ospite, rigetto del trapianto di organi o di infezione.

La porzione di ligando permutata circolarmente del polipeptide di fusione è scelta secondo l'utilizzo previsto. Le proteine che possono fungere da bersagli per i ligandi permutati circolarmente includono ma non in via limitativa molecole di trasmissione del segnale come fattori di crescita o frammenti biologicamente attivi o mutanti degli stessi. Per esempio, il fattore di crescita può essere una citochina (per esempio

un'interleuchina o chemochina). Sebbene un tecnico del ramo di ordinaria competenza possa prontamente determinare se una molecola è una molecola di trasmissione del segnale (ovvero se è prodotta e secreta da un primo tipo di cellula ed esercita un effetto su se stessa o (autocrina) o su un secondo tipo di cellula (paracrina), di solito legando specificamente un recettore), varie molecole di trasmissione del segnale particolari possono essere correttamente posizionate in due o più categorie. Per esempio, IL-1 può essere considerata correttamente come una citochina o interleuchina e l'eritropoietina può essere correttamente considerata come un fattore di crescita o un ormone; eccetera.

Una citochina include ma non in via limitativa, IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p35, IL-13, IL-15, membri della famiglia di IL-17, IL18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-23p19, IL-30 (IL27p28), IL-33, IL-34, IL-35, IL-35p35, IL-36Ra, IL-36a, IL-36b, IL-36g, IL-37, IL-38, LIF, CNTF, Oncostatina M, CLCF-1, GCSF, GM-CSF, ferritina, lattogeno placentare, apolipoproteina e, interferone-alfa (IFN α), interferone-beta (IFN β), o interferone-gamma (IFN γ). Una chemochina può essere un membro della sottofamiglia α e/o può legare un recettore di CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, o CXCR5; essa può essere un membro della sottofamiglia β e/o può legare una molecola CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, o CCR11. Una chemochina può anche essere linfotattina o un'altra chemochina che lega un recettore di

XCR1; una chemochina può anche essere fractalchina o può legare un recettore di CX₃CR1. Per esempio, la chemochina può essere CCL7, CCL23, CCL27, CCL28, CXCL12, CXCL14, o CXCL15.

Fattori di crescita includono ma non in via limitativa membri della famiglia del fattore di necrosi tumorale (TNF), membri della famiglia del fattore di crescita nervoso (NGF), membri della famiglia del fattore di crescita trasformante (TGF), membri della famiglia di GDF, membri della famiglia di BMP, membri della famiglia del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) (inclusi FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8a, FGF-8b, FGF-8e, FGF-8f, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-22, FGF-23, membri della famiglia del fattore di crescita insulino-simile (IGF), membri della famiglia del fattore di crescita dell'epidermide (EGF) o membri della famiglia del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). Per esempio, il fattore di crescita può essere TNF, EGF, TGF α , TGF β , FGF, NGF, eritropoietina, IGF-1, o IGF-2.

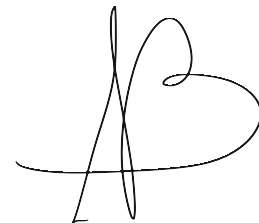
Un ormone può essere un ormone prodotto da ghiandola surrenale, ghiandola paratiroidea, ghiandola pituitaria, o ghiandola tiroidea; esso può anche essere prodotto da ipotalamo, ovaio, testicolo, pancreas, corpo pineale o timo. Per esempio, l'ormone può essere un ormone tiroide-stimolante, un ormone follicolo-stimolante, un ormone luteinizzante, prolattina, ormone della crescita, ormone adrenocorticotropico, ormone antidiuretico, ossitocina, ormone

rilasciante la tirotropina, ormone rilasciante la gonadotropina, ormone rilasciante l'ormone della crescita, ormone rilasciante corticotropina, somatostatina, dopamina, melatonina, tirossina, calcitonina, ormone paratiroideo, un glucocorticoide, un mineralocorticoide, un androgeno, adrenalina, un estrogeno, progesterone, gonadotropina corionica umana, insulina, glucagone, somatostatina, eritropoietina, calcitriolo, peptide atriale-natriuretico, gastrina, secretina, colecistochinina, somatostatina, neuropeptide Y, grelina, PYY₃₋₃₆, fattore di crescita insulino-simile-1, angiotensinogeno, trombopoietina o leptina.

I neurotrasmettitori includono acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina, istamina o epinefrina. Il neurotrasmettitore può anche essere un peptide neuroattivo (per esempio bradichinina, colecistochinina, gastrina, secretina, ossitocina, un peptide del sonno, ormone rilasciante gonadotropina, beta-endorfina, encefalina, sostanza P, somatostatina, prolattina, galanina, ormone rilasciante l'ormone della crescita, bombesina, dinorfina, neurotensina, motilina, tirotropina, neuropeptide Y, ormone luteinizzante, calcitonina o peptide intestinale vasoattivo). Molecole co-stimolatrici adeguate includono B7-1 e B7-2.

Composizioni farmaceutiche

La presente invenzione fornisce composizioni farmaceutiche che comprendono proteine di fusione dell'invenzione e almeno un trasportatore farmaceuticamente accettabile. Le proteine di fusione della presente invenzione possono essere formulate secondo metodi noti in modo da preparare composizioni farmaceuticamente utili, per cui



il polipeptide è combinato con un veicolo trasportatore farmaceuticamente accettabile, come soluzioni acquose o tamponi, sospensioni ed emulsioni farmaceuticamente accettabili. Esempi di solventi non acquosi includono propil etilene glicole, glicole polietilenico e oli vegetali. Formulazioni terapeutiche sono preparate per la conservazione miscelando il principio attivo avente il grado di purezza desiderato con trasportatori, eccipienti o stabilizzanti facoltativi fisiologicamente accettabili, come descritto in Remington's Pharmaceutical Sciences 16esima edizione, Osol, A. Ed. (1980), sotto forma di formulazioni liofilizzate o soluzioni acquose.

Più in particolare, le presenti composizioni farmaceutiche possono essere somministrate per la terapia mediante qualsiasi via adeguata inclusa sottocutanea, sottocutanea o intratecalmente mediante pompa per infusione, intramuscolare, endovenosa, intradermica, intravitreale, nasale e polmonare. Sarà anche apprezzato che la via preferita varierà con l'agente terapeutico, condizione ed età del ricevente, e la malattia che viene trattata.

In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica è somministrata per via sottocutanea. In questa forma di realizzazione, la composizione può essere fornita come una polvere liofilizzata in modo da essere ricostituita prima della somministrazione. La composizione può anche essere fornita in una forma liquida, la quale può essere somministrata direttamente a un paziente. In una forma di realizzazione, la composizione è fornita come un liquido in una siringa

pre-riempita in modo che un paziente possa facilmente auto-somministrarsi la composizione.

In un'altra forma di realizzazione, le composizioni della presente invenzione sono incapsulate in liposomi, che hanno dimostrato utilità nell'erogare agenti attivi benefici in una maniera controllata per periodi prolungati di tempo. I liposomi sono membrane a doppio strato chiuse contenenti un volume acquoso intrappolato. I liposomi possono anche essere vescicole unilamellari che possiedono vescicole a doppio strato con membrana singola o multilamellari con più doppi strati di membrana, ciascuno separato dal successivo mediante uno strato acquoso. La struttura del doppio strato della membrana risultante è tale che le code idrofobe (non-polari) del lipide sono orientate verso il centro dello strato doppio mentre le teste idrofile (polari) guardano verso la fase acquosa. In una forma di realizzazione, il liposoma può essere rivestito con un polimero solubile in acqua flessibile che evita l'assorbimento da parte degli organi del sistema mononucleare di fagociti, principalmente il fegato e la milza. Polimeri idrofili adeguati per circondare i liposomi includono, senza limitazione, PEG, polivinilpirrolidone, polivinilmetilene, polimetilossazolina, polietilossazolina, poliidrossipropilossazolina, poliidrossipropilmetacrilammide, polimetacrilammide, polidimetilacrilammide, poliidrossipropilmetacrilato, poliidrossetilacrilato, idrossimetilcellulosa idrossietilcellulosa, polietilenglicole, poliaspartammide e sequenze peptidiche idrofile come descritto nei

brevetti U.S. No. 6,316,024; 6,126,966; 6,056,973 e 6,043,094.

I liposomi possono essere costituiti da qualsiasi lipide o combinazione di lipidi noti nell'arte. Per esempio, i lipidi che formano vescicole possono essere presenti in natura o lipidi sintetici, inclusi fosfolipidi, come fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, acido fosfatidico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerolo, fosfatidilinositolo e sfingomielinina come divulgato nei brevetti U.S. No. 6,056,973 e 5,874,104. I lipidi che formano vescicole possono anche essere glicolipidi, cerebrosidi, o lipidi cationici, come 1,2-dioleilossi-3-(trimetilammino) propano (DOTAP); N-[1-(2,3,-ditetradecilossi)propil]-N,N-dimetil-N-idrossietilammonio bromuro (DMRIE); N-[1-(2,3,-dioleilossi)propil]-N,N-dimetil-N-idrossi etilammonio bromuro (DORIE); N-[1-(2,3-dioleilossi)propil]-N,N,N-trimetilammonio cloruro (DOTMA); 3 [N-(N',N'-dimetilammino) etano] carbamoli] colesterolo (DC-Chol); o dimetildiottadecilammonio (DDAB) come divulgato anche nel brevetto U.S. No. 6,056,973. Il colesterolo può essere presente anche nell'intervallo corretto per impartire stabilità alla vescicola come divulgato nei brevetti statunitensi No. 5,916,588 e 5,874,104.

Per le formulazioni liquide, una proprietà desiderata è che la formulazione possa essere fornita in una forma che possa passare attraverso un ago di calibro 25, 28, 30, 31, 32 per somministrazione endovenosa, intramuscolare, intraarticolare o sottocutanea.

In altre forme di realizzazione, la composizione può essere erogata tramite via intranasale in modo da consentire il trasferimento

degli agenti attivi attraverso passaggi olfattivi nel SNC e ridurre la somministrazione sistemica. I dispositivi comunemente utilizzati per questa via di somministrazione sono inclusi nel brevetto U.S. No. 6,715,485. Le composizioni erogate tramite questa via possono consentire l'aumento del dosaggio al SNC o la riduzione del carico corporeo totale riducendo i rischi di tossicità sistemici associati a determinati farmaci. La preparazione di una composizione farmaceutica per l'erogazione in un dispositivo impiantabile subdermicamente può essere effettuata utilizzando metodi noti nell'arte, come quelli descritti, per esempio, nei brevetti U.S. No. 3,992,518; 5,660,848; e 5,756,115.

Una composizione farmaceutica tipica per la somministrazione parenterale sarebbe da circa 0,1 a 3 mg/kg per paziente al giorno. Metodi per la preparazione di composizioni somministrabili per via parenterale saranno noti o evidenti ai tecnici del ramo e sono descritti in maggiore dettaglio in pubblicazioni come Remington's Pharmaceutical Science, 15esima ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

Le somministrazioni singole o multiple delle composizioni possono essere somministrate a seconda del dosaggio e della frequenza secondo quanto necessario e tollerato dal paziente. In qualsiasi evento, la composizione dovrebbe fornire una qualità sufficiente delle proteine di questa invenzione in modo da trattare efficacemente il paziente.

ESEMPI

Gli esempi seguenti sono offerti a titolo illustrativo e non devono

essere intesi come limitativi dell'invenzione come rivendicato in qualsiasi modo.

Riferimento

Esempio 1. Progettazione, preparazione, espressione e purificazione di costrutti di fusione Picasso

1. Progettazione di IL-6 permutata circolarmente e fusione al dominio D1 del recettore di gp130

La struttura cristallina del complesso esamerico di trasmissione del segnale di IL-6 (1P9M.pdb; FIG. 1) è stata utilizzata per progettare una variante permutata circolarmente di IL6 umana, chiamata picasso3 (FIG. 2; RDB1503; SEQ ID N.: 1 (proteina) e SEQ ID NO: 2 (acido nucleico)), in modo tale che il C-terminale ingegnerizzato possa essere fuso all'N-terminale del dominio D1 di gp130 nel complesso attraverso un distanziatore corto. In breve, i terminali N e C ingegnerizzati in picasso3 corrispondono ai residui 182 e 180 in IL-6 di tipo selvatico (SEQ ID NO: 3) e i terminali di IL-6 nativi sono stati uniti tramite un connettore di 7 amminoacidi. Il dominio D1 di gp130 è stato scelto come partner di fusione in modo che non solo interferirebbe stericamente con la formazione di esameri, ma potenzierebbe anche l'affinità di legame a IL-6R attraverso interazioni native presenti nel complesso (FIG. 3B). Il C-terminale ingegnerizzato di picasso3 è stato fuso al dominio D1 attraverso un distanziatore da due amminoacidi in modo da formare RDB1527 (FIG. 3B; SEQ ID N.: 4 (proteina) e SEQ ID NO: 5 (acido nucleico)). Come controllo è stata progettata una proteina

di fusione analoga costituita da IL6 nativa fusa a D1 (RDB1529) (FIG. 3A; SEQ ID N.: 6 (proteina) e SEQ ID NO: 7 (acido nucleico)).

2. Sintesi genica

La sintesi dei geni per l'espressione dei costrutti progettati è stata eseguita utilizzando metodi standard.

3. Subclonazione del gene sintetizzato in un vettore di espressione di mammifero

A) Preparazione del vettore di espressione pcDNA™ (Invitrogen).

5 µg di pcDNA sono stati digeriti con BamHI e HindIII per due ore a 37 °C. La digestione è stata trattata con fosfatasi alcalina di vitello per rimuovere 5' fosfato, prevenendo quindi la riligazione del vettore su se stesso. Il tampone è stato sostituito per rimuovere i sali dalla reazione di fosfatasi alcalina di vitello. Il kit di purificazione dei prodotti PCR di Qiagen è stato utilizzato secondo il protocollo suggerito dal produttore. Il DNA è stato eluito in 30 µl di H₂O.

B) Preparazione del gene di interesse.

Il gene di interesse è stato digerito con BamHI e HindIII per due ore a 37 °C. La reazione di digestione è stata condotta su un apparecchio E-Gel® CloneWell™ (Invitrogen) utilizzando lo 0,8% di SYBR Green. Il frammento corrispondente al gene di interesse è stato isolato dalla seconda fila di pozzetti sul gel.

C) Reazione di ligazione del gene a pcDNA.

Il pcDNA preparato (fase A) è stato miscelato con il DNA della

fase B in presenza di ligasi di T4 e incubato a temperatura ambiente per 30 minuti. In seguito alla ligazione, i prodotti sono stati trasformati in cellule TOP10 (Invitrogen; ceppo chimicamente competente di *E. coli*) e il clone corretto è stato prelevato e conservato come stock di glicerolo a -80 °C.

4. Espressione di RDB1503, RDB1527 e RDB1529

Tutte le proteine sono state espresse in cellule CHO utilizzando il reagente FreeStyle™ Max (Invitrogen) seguendo il protocollo del produttore. In breve, un giorno prima della trasfezione le cellule sono state seminate a $0,5 \times 10^6$ cellule/mL e il giorno della trasfezione sono state regolate a 1×10^6 cellule/mL come consigliato dal produttore. Per una trasfezione da 1 litro, sono state preparate due provette (A e B) di terreni (OptiPRO™, Invitrogen) contenenti circa 19 ml, 1 mg di DNA è stato aggiunto nella provetta A e 1 ml di reagente FreeStyle™ Max è stato aggiunto alla provetta B. Immediatamente i contenuti di entrambe le provette sono stati miscelati e incubati a temperatura ambiente per 15 minuti. Dopo il periodo di incubazione la miscela è stata aggiunta lentamente a 1 litro di cellule CHO. Dopo la trasfezione le cellule sono state lasciate per da 6 a 7 giorni e poi il surnatante è stato raccolto.

5. Purificazione di RDB1527 e RDB1529

La proteina espressa nel surnatante è stata catturata su una colonna di proteina A per legare la porzione Fc della proteina di fusione. In seguito al legame della proteina, la colonna è stata lavata con fino a un volume di colonna 5 di PBS. La proteina è stata eluita dalla colonna

abbassando il pH del tampone da corsa e neutralizzata direttamente con tampone Tris pH = 7. La proteina purificata è stata poi dializzata per tutta la notte contro PBS.

Esempio di riferimento 2. Attività *in vitro* di proteine di fusione di IL6 permutate circolarmente

Le cellule di IL-6 HEK-Blue™ (Invivogen) sono cellule di rene embrionale umano specificamente progettate per rilevare l'IL-6 bioattiva *in vitro* monitorando l'espressione indotta da IL-6 di un gene reporter di fosfatasi alcalina embrionica secreta (SEAP) inducibile da STAT3. La SEAP può essere prontamente monitorata quando si utilizza il terreno di rilevamento della SEAP QUANTI-Blue™ (Invivogen). La linea cellulare umana e il terreno di rilevamento sono stati utilizzati per testare la capacità di IL6 permutata circolarmente e dei costrutti delle proteine di fusione di IL6 RDB1503, RDB1527 e RDB1529 di agonizzare o antagonizzare la SEAP indotta da IL-6.

100 µL di terreni contenenti cellule di IL-6 HEK-Blue™ sono stati piastrati in piastre per microtitolazione da 96 pozzetti fino a una concentrazione finale di 50.000 cellule/pozzetto. Per misurare l'attività agonista, IL6 e RDB1503 sono stati preparati a concentrazione iniziale di 200 pM poi diluiti in serie e aggiunti in campioni per test duplicato alle cellule di IL-6 HEK-Blue™. Per misurare la potenza antagonista, RDB1527 e RDB1529 sono stati preparati a concentrazione iniziale di 3,3 nM poi diluiti in serie e aggiunti in campioni per test duplicato alle cellule di IL-6 HEK-Blue™ in presenza di una concentrazione costante

di IL6 di 12,5 pM. I campioni sono stati incubati a 37 °C, 5% di CO₂ da 20-24 ore, poi 40 µL di ciascun campione sono stati trasferiti in una nuova piastra da 96 pozzetti contenente 160 µL di QUANTI-Blue™ in ciascun pozzetto e incubati a 37 °C, 5% di CO₂. Le letture di assorbanza sono state prese a 630 nm dopo 3 ore di incubazione.

L'IL-6 permutata circolarmente (RDB1503) ha dimostrato attività agonista con una EC₅₀ paragonabile a quella di IL-6 (FIG. 4). RDB1527 (CP_IL-6_D1_Fc) è stato in grado di inibire l'espressione di SEAP indotta da IL-6 in una maniera dose-dipendente con un valore IC₅₀ di 0,22 nM (FIG. 5). Al contrario, RDB1529 (IL-6_D1_Fc non modificata) non ha mostrato nessun effetto antagonista (FIG. 5).

Sono state tratte le seguenti conclusioni: 1) la permutazione circolare di IL-6 determina nessuna perdita di affinità di legame; 2) la fusione del dominio D1 di gp130 al C-terminale di IL-6 di tipo selvatico non converte l'IL-6 in un potente antagonista, mentre la fusione del dominio D1 di gp130 al C-terminale dell'IL-6 permutata circolarmente determina potente antagonismo della trasmissione del segnale mediata da IL-6.

Esempio di riferimento 3. Misurazioni cinetiche di wtIL6, RDB1527 e RDB1529

IL6-Fc di tipo selvatico (wtIL6), RDB1527 e RDB1529 sono stati immobilizzati su un chip del sensore Biacore™ utilizzando il kit di cattura degli anticorpi umani (GE Healthcare) secondo il protocollo del produttore. IL-6R è stata fatta passare sulla superficie del chip in un

modello per gradi. IL-6R è stata preparata in 5 concentrazioni; 3,0 nM, 1,0 nM, 0,33 nM, 0,11 nM e 0,03 nM. Nel primo ciclo la concentrazione di 0,03 nM di IL-6R è stata fatta fluire sul ligando legato sulla superficie del chip per 180 secondi, dopodiché una soluzione in bianco è stata fatta passare sulla superficie per consentire all'IL-6R di dissociarsi. La stessa procedura è stata ripetuta per altre quattro volte utilizzando una concentrazione crescente da 0,03 a 3 nM di 6R. I sensogrammi risultanti sono stati analizzati con il software dello strumento nativo per calcolare le affinità di legame dei costrutti.

L'affinità di legame di RDB1527 rispetto a IL-6R è stata calcolata essere di 40 pM (FIG. 6C), che rappresenta un aumento di oltre 200 volte rispetto all'affinità del controllo wtIL6 (9 nM, FIG. 6A). Il sensogramma per RDB1529 (FIG. 6B) ha determinato uno scarso adattamento e quindi l'affinità di legame calcolata non è affidabile. Questo può essere dovuto al legame misto tra IL-6 e IL-6R e indipendentemente D1 e IL-6R.

In base ai risultati si è concluso che l'affinità di legame di RDB1527 rispetto a IL-6R è di 40 pM, o superiore a 200 volte più alta di quella di wtIL6. Questi dati, in combinazione con la potente attività antagonista, suggeriscono fortemente che i determinanti di legame su IL-6 e su D1 si legano simultaneamente a IL-6R, e prevengono l'associazione del complesso di trasmissione del segnale, come progettato.

Riferimento

Esempio 4. Progettazione di IL-1 β permutata circolarmente fusa a domini D1-D2 di IL-1RI (RDB1538)

La struttura cristallina del complesso di trasmissione del segnale eterotrimerico di IL-1 β (4DEP.pdb; FIG. 7A) è stata utilizzata per disegnare una variante permutata circolarmente di IL-1 β (RDB1515; SEQ ID NO: 8 (proteina) e SEQ ID NO: 9 (acido nucleico)), in modo tale che il N-terminale ingegnerizzato possa essere fuso al C-terminale del dominio D1-D2 di IL-1RI attraverso un distanziatore corto. In breve, i terminali N e C ingegnerizzati corrispondono ai residui 224 e 223, rispettivamente, in IL-1 β di tipo selvatico, e i terminali di IL-1 β nativa sono stati uniti attraverso un linker da 7 amminoacidi. L'N-terminale appena creato è stato fuso al dominio D1-D2 di RI con un distanziatore da 5 amminoacidi e un tag FLAG è stato aggiunto all'N-terminale di RI, determinando RDB1538 (FIG. 7B; SEQ ID N.: 10 (proteina) e SEQ ID NO: 11 (acido nucleico)). La proteina di fusione risultante è progettata per essere un antagonista della trasmissione del segnale mediata da IL-1 β legandosi a IL-1RAcP e prevenendo l'assemblaggio del complesso di trasmissione del segnale completo.

Riferimento

Esempio 5. Progettazione di IL-2 permutata circolarmente fusa a IL-2R α (RDB1405)

In seguito al legame di IL-2R α , la conformazione di legame di IL-2 è stabilizzata in modo da consentire la formazione di un complesso di alta affinità con IL-2R β e γ_c . RDB1405 è progettata per essere un

super agonista della trasmissione del segnale mediata da IL-2, in particolare nelle cellule prive di IL-2R α , in quanto sarebbe in grado di formare il complesso di alta affinità senza necessitare del legame all'IL-2R α associata alle cellule. La struttura cristallina del complesso di trasmissione del segnale quaternario di IL-2 (2B5l.pdb; FIG. 8A) è stata utilizzata per progettare una variante permutata circolarmente di IL-2, in modo che il C terminale ingegnerizzato possa essere fuso all'N-terminale di IL-2R α attraverso un distanziatore corto. In breve, i terminali N e C ingegnerizzati corrispondono ai residui 95 e 94, rispettivamente, nell'IL-2 di tipo selvatico. Il C-terminale di IL-2 nativa è stato unito al residuo 4 di IL-2 attraverso un linker a 2 amminoacidi. Infine il C-terminale appena creato è stato fuso all'N-terminale di IL-2R α attraverso un distanziatore a 6 amminoacidi e il C-terminale di IL-2R α è stato fuso all'IgG1 Fc umana, determinando RDB1405 (FIG. 8B; SEQ ID N.: 12 (proteina) e SEQ ID NO: 13 (acido nucleico)).

Esempio 1. Progettazione di proteine di fusione permutate circolarmente

È stata progettata una proteina di fusione di IL-2 o IL-15 con selettività migliorata per cellule che esprimono IL-2R $\beta\gamma$ (ma non IL-2R α) rispetto a cellule che esprimono IL-2R $\alpha\beta\gamma$ in confronto a IL-2 di tipo selvatico (IL-2 di tipo selvatico ha una preferenza più alta per cellule che esprimono IL-2R $\alpha\beta\gamma$). Fondendo IL-2R α a IL-2 o IL-15R α a IL-15, la proteina di fusione risultante ha avuto maggiore attività sulle cellule prive della rispettiva catena alfa (IL-2R α o IL-15R α) rispetto al ligando

nativo, e si ridurrebbe la preferenza per le cellule che esprimono la rispettiva catena alfa. Quindi, il rapporto di attività, $EC_{50}(\text{IL-2R}\alpha\beta\gamma^+)/EC_{50}(\text{IL-2R}\alpha\text{IL-2R}\beta\gamma^+)$ aumenterebbe per le proteine di fusione di CP-IL-2-IL-2R α , sarebbe inferiore per IL-2 di tipo selvatico. Ci si aspetterebbero risultati analoghi per le proteine di fusione CP-IL-15-IL-15R α . La permutazione circolare della citochina è necessaria per orientare approssimativamente i terminali in una posizione ottimale per la fusione in quanto in terminali nativi sono orientati distalmente rispetto alle catene alfa nel complesso di trasmissione del segnale.

Risultati: Nelle cellule prive di IL-2R α , ma che esprimono IL-2R $\beta\gamma$ (linea cellulare HH)ⁱ, i costrutti ingegnerizzati sono efficaci (di fatto, da due a cinque volte meglio) quanto la Proleuchina nel promuovere la fosforilazione STAT5 (Figura 11A, pannello di sinistra). Al contrario, in una linea cellulare che esprime il complesso del recettore di alta affinità eterotrimerico, IL-2R $\alpha\beta\gamma$, (linea cellulare CTLL-2)ⁱⁱ, due dei costrutti ingegnerizzati (RDB1411, RDB1413) sono da 100 a 300 volte meno attivi della Proleuchina secondo quanto misurato mediante proliferazione cellulare. Nel complesso, i costrutti ingegnerizzati mostrano una selettività tra 400 e 600 volte superiore per le cellule prive di IL-2R α , rispetto a IL-2 di tipo selvatico, e quindi hanno il potenziale di fornire un profilo terapeutico migliorato. Nonostante sia stato osservato l'aumento del rapporto dell'attività, come previsto, è stato sorprendente che l'effetto maggiore sull'aumento del rapporto sia stata la notevole perdita di attività (da 100 a 300 volte) nelle cellule

contenenti IL-2R α , piuttosto che un miglioramento dell'attività (solo da 2 a 5 volte) per le cellule prive di IL-2R α .

Nelle cellule prive di IL-2R α , ma che esprimono IL-2R $\beta\gamma$ (linea cellulare HH)ⁱ, i costrutti ingegnerizzati sono potenti attivatori della fosforilazione STAT5, ma circa 10 volte meno potenti dell'IL-15 di tipo selvatico (Figura 12A, pannello di sinistra). In una linea cellulare che esprime il complesso eterotrimerico del recettore di alta affinità, IL-2R $\alpha\beta\gamma$, (linea cellulare CTLL-2)ⁱⁱ, i costrutti ingegnerizzati (RDB1408, RDB1416) sono da 2000 a 6000 volte meno attivi dell'IL-15 di tipo selvatico secondo quanto misurato mediante proliferazione cellulare. Nel complesso, i costrutti ingegnerizzati mostrano una selettività tra 200 e 600 volte superiore per le cellule prive di IL-2R α , rispetto a IL-15 di tipo selvatico. Nonostante sia stato osservato l'aumento del rapporto dell'attività, come previsto, è stato sorprendente che l'effetto maggiore sull'aumento del rapporto sia stata la notevole perdita di attività (da 2000 a 6000 volte) nelle cellule contenenti IL-2R α e che una perdita dell'attività di 10 volte è stata osservata per le cellule prive di IL-2R α .

Costrutti:

RDB1409: CP-IL-2(C145S)-FLAG; IL-2 permutata circolarmente. La mutazione C145S è analoga a quella nella Proleuchina (rhIL-2) per migliorare le proprietà fisiche della proteina. Il tag FLAG è aggiunto per facilità di purificazione.

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSI
ISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK
KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQGSYKDDDDK (SEQ ID NO: 24)

RDB1411: CP-IL-2(C145S)-IL-2R α -Fc; IL-2 permutata circolarmente fusa a IL-2R α . La mutazione C145S è analoga a quella nella Proleuchina (rhIL-2) per migliorare le proprietà fisiche della proteina. Fc è aggiunto per facilità di purificazione.

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSI
ISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK
KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMA
YKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNT
TKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYH
FVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGGGGS
EPKSSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)

RDB1413: CP-IL-2(C145S)-IL-2R α -FLAG; IL-2 permutata circolarmente fusa a IL-2R α . La mutazione C145S è analoga a quella nella Proleuchina (rhIL-2) per migliorare le proprietà fisiche della proteina. Il tag FLAG è aggiunto per facilità di purificazione. Costrutto analogo a RDB1411, che sostituisce Fc con FLAG.

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSI
ISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK
KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMA
YKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNT
TKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYH
FVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGDYK
DDDDK (SEQ ID NO: 26)

RDB1408: Fc-IL-15R α (sushi)-CP-IL-15; IL-15 permutata circolarmente fusa al dominio sushi di IL-15R α . Fc è aggiunto per

facilità di purificazione.

EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSG
FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDGGSELEEKNIKEFLQSFVHI
VQMFINGGGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCF
LLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKEC (SEQ ID NO:
27)

RDB1416: FLAG-IL-15R α (sushi)-CP-IL-15; IL-15 permutata circolarmente fusa al dominio sushi di IL-15R α . Il tag FLAG è aggiunto per facilità di purificazione. Costrutto analogo a RDB1408, che sostituisce Fc con FLAG.

DYKDDDDKGSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTE
CVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDGGSELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINGGGSN
WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG
DASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKEC (SEQ ID NO: 28)

Benché questa invenzione sia stata mostrata e descritta in particolare con riferimenti alle forme di realizzazione preferite della stessa, risulterà chiaro ai tecnici del ramo che vari cambiamenti di forma e dettagli possono essere fatti senza discostarsi dalla portata dell'invenzione contemplata dalle rivendicazioni allegate. Resta anche inteso che le forme di realizzazione descritte nel presente documento non sono mutuamente esclusive e che le caratteristiche delle varie forme di realizzazione possono essere combinate in tutto o in parte secondo l'invenzione.

ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> ALKERMES, INC.

<120> LIGANDI MODIFICATI MEDIANTE PERMUTAZIONE
CIRCOLARE COME AGONISTI E ANTAGONISTI

<130> P61599EP-K/JAV

<140> EP13801437.8

<141> 06/06/2013

<150> 61/778,575

<151> 13/03/2013

<150> 61/778,812

<151> 13/03/2013

<150> 61/723,081

<151> 06/11/2012

<150> 61/657,264

<151> 08/06/2012

<150> 61/657,378

<151> 08/06/2012

<150> 61/657,285

<151> 08/06/2012

<160> 28

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 170

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 1

Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser
1 5 10 15

Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg
35 40 45

Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys
50 55 60

Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu
65 70 75 80
Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe
85 90 95

Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe
100 105 110

Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu
130 135 140

Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr
145 150 155 160

Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln
165 170

<210> 2

<211> 516

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polinucleotide
sintetico

<400> 2
cagaaccagt ggctgcagga catgaccacc cacctgatcc tgcggtcctt caaagagttc 60
ctgcagtcct ccttgcgggc cctgagacag atgagcggag gatctggcgg aggtcctct 120
gagcggatcg acaagcagat ccggtacatc ctggacggca tctccgcctt gcggaagag 180
acatgcaaca agtccaacat gtgcgagtc cagcaagagg ccctggccga gaacaacctg 240
aacctgccca agatggctga gaaggacggc tgcttccagt ccggcttcaa cgaagagact 300
tgcctggtca agatcatcac cggcctgctg gaatttgagg tgtacctgga atacctgcag 360
aacagattcg agtccctccga ggaacaggcc agagccgtgc agatgtccac caagtgctg 420
atccagtttc tgcagaagaa ggccaagaac ctggacgcta tcaccacccc cgacctacc 480
accaatgcct ccttgcctgac caagctgcag tgataa 516

<210> 3

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
20 25 30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
35 40 45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
195 200 205

Leu Arg Gln Met
210

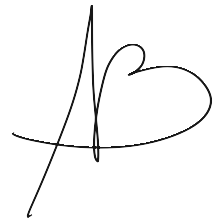
<210> 4

<211> 511

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>



<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 4

Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser
1 5 10 15

Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg
35 40 45

Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys
50 55 60

Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu
65 70 75 80

Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe
85 90 95

Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe
100 105 110

Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu
130 135 140

Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr
145 150 155 160

Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Ser Glu Leu Leu Asp
165 170 175

Pro Cys Gly Tyr Ile Ser Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser
180 185 190

Asn Phe Thr Ala Val Cys Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe
195 200 205

His Val Asn Ala Asn Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile
210 215 220

Pro Lys Glu Gln Tyr Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr
225 230 235 240

Phe Thr Asp Ile Ala Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu
245 250 255

Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser
260 265 270

Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
275 280 285

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
290 295 300

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
305 310 315 320

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
325 330 335

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
340 345 350

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
355 360 365

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
370 375 380

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
385 390 395 400

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
405 410 415

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
420 425 430

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
435 440 445

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
450 455 460

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
465 470 475 480

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
485 490 495

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505 510

<210> 5



<211> 1539

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polinucleotide

sintetico

<400> 5

caaaaccagt ggctccagga tatgaccacc cacctcatcc tcagaagttt caaggagttc 60
ctccagttca gcctgagggc tctgaggcaa atgagcggag gctccggcgg aggagctcc 120
gagagaatcg acaagcagat caggtacatc ctcgatggca tcagcgcctt cagaaaagaa 180
acctgtaata agagcaacat gtgtgagagc agcaaggaag ccctcgccga gaacaatctg 240
aacctcccca aatgggctga gaaggacgga tgcttccaga ggggcttcaa tgaggagaca 300
tgctcgtga agatcatcac aggactcctg gagttoagaag tctacctgga gtacctccag 360
aacaggttcg aatocagcga ggaacaggct agggctgtgc agatgtccac caagtgctg 420
atccagttcc tccagaagaa ggccaagaat ctggatgcca tcaccacacc cgatcctaca 480
accaacgcca gcctgctgac caagctccag gcctccgaac tcctggacce ttgtggctac 540
atttccctg aaagccctgt ggtgcaactc cacagcaatt tcacagccgt ctgtgtgctc 600
aaggagaagt gcatggacta ctttcacgtg aatgctaatt atatcgtgtg gaagacaaac 660
cacttcacca tccccagga gcagtatacc atcatcaaca ggaccgctc cagcgtgaca 720
ttcaccgaca tcgcttcctt caacattcag ctgacctgca atatcctcac cttcggccag 780
ctggagcaga acgtgtacgg aatcaccatc attagcggcc tcgtccctag aggctccgaa 840
cccaagtctt ccgataaaac ccatacctgc ccccttgcc ctgctcccga actcctcggc 900
ggccccagcg tgtttctctt ccctcccaag cccaagata cctgatgat cagcaggaca 960
cccgaagtca cctgctggtt ggtcgacgtg tcccacgagg accccgaggt caaattcaac 1020
tggtacgtcg atggcgtgga ggtgcataat gctaagacca agcccaggga ggagcagtac 1080
aactccacat acaggggtgt ctccgtcctg accgtgctgc atcaagactg gctgaacggc 1140
aaggagtata agtgcaaggt gagcaataaa gccctccccg cccctattga gaagaccatt 1200
tccaaggcca agggccagcc tagagaacct caagtctaca cactcccccc ctccaggag 1260
gagatgacca aaaatcaggt ctccctgacc tgctcgtgga agggcttcta tcctagcgac 1320
atcgccgtcg agtgggagag caacggacag cccgagaaca actacaaaac cacacctccc 1380
gtgctcgaca gcgacggcag cttcttctct tactccaagc tcaccgtgga taagtccagg 1440
tggcagcaag gcaacgtgtt tagctgcagc gtgatgcagc aagctctcca caaccactat 1500
accagaagt ccctcagcct cagccctggc aagtagtga 1539

<210> 6

<211> 506

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide sintetico

<400> 6

Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp
1 5 10 15

Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys
20 25 30

Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys
35 40 45

Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr
50 55 60

Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala
85 90 95

Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala
100 105 110

Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser
115 120 125

Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr
130 135 140

Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu
145 150 155 160

Arg Ala Leu Arg Gln Met Ser Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile
165 170 175

Ser Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val
180 185 190

Cys Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn
195 200 205

Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr
210 215 220

Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala
225 230 235 240

Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu
245 250 255

Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Val Pro Arg
260 265 270

Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
275 280 285

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
290 295 300

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
305 310 315 320

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
325 330 335

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
340 345 350

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
355 360 365

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
370 375 380

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
385 390 395 400

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
405 410 415

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
420 425 430

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
435 440 445

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
450 455 460

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
465 470 475 480

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
485 490 495

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 7

<211> 1524

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polinucleotide

sintetico

<400> 7

ctgacctcca gcgaaaggat cgacaagcag atcaggtaca tctctgacgg catctccgct 60
ctcagaaagg agacctgcaa caagagcaac atgtgcgaga gcagcaagga agccctggct 120
gagaacaatc tcaacctgcc caagatggcc gaaaaggatg gatgcttcca gagcggcttt 180
aacgaggaga cctgcctcgt gaagatcatc accggcctgc tcgagtttga ggtgtatctc 240
gagtacctgc agaataggtt cgagagcagc gaggaacagg ctagagctgt ccagatgtcc 300
accaagggtgc tgatccagtt cctgcaaaag aaggccaaga atctcgacgc tatcaccacc 360
cctgacccta ccacaaacgc cagcctgctg accaagctgc aggcccaaaa ccaatggctc 420
caggacatga caaccacct gatcctgagg agcttcaagg agttcctcca atcctccctc 480
agggccctga gacagatgag cgaactgctc gacccttgtg gatacattag ccctgaatcc 540
cccgtgggtgc agctgcatag caatttcacc gccgtgtgcg tgctcaaaga gaagtgcattg 600
gactacttcc atgtgaacgc caactacatc gtgtggaaga ccaaccattt caccatcccc 660
aaggagcaat acaccatcat caacagaacc gccagcagcg tcacattcac cgacatcgcc 720
tccctgaaca tccaactgac atgcaacatt ctcaccttcg gccagctgga gcaaaatgtg 780
tacggcatca ccatcattag cggcctcgtc cctagaggct cogaaccaa gtcctccgat 840
aaaaccata cctgcccccc ttgccctgct cccgaactcc tcggcggccc cagcgtgttt 900
ctcttcctc ccaagcccaa agataccctg atgatcagca ggacaccga agtcacctgc 960
gtggtgggtcg acgtgtccca cgaggacccc gaggtcaaat tcaactggtc cgtcgatggc 1020
gtggagggtgc ataatgctaa gaccaagccc agggaggagc agtacaactc cacatacagg 1080
gtggtctccg tcttgaccgt gctgcatcaa gactggctga acggcaagga gtataagtgc 1140
aagtgagca ataaagccct ccccgccctc attgagaaga ccatttcaa ggccaagggc 1200
cagcctagag aacctcaagt ctacacactc cccccctcca gggaggagat gaccaaaaat 1260
caggtctccc tgacctgcct ggtgaagggc ttctatccta gcgacatcgc cgtcagtggtg 1320
gagagcaacg gacagcccga gaacaactac aaaaccacac ctcccgtgct cgacagcgac 1380
ggcagcttct tctgtactc caagctcacc gtggataagt ccaggtggca gcaaggcaac 1440
gtgttttagct gcagcgtgat gcacgaagct ctccacaacc actataccca gaagtccctc 1500
agcctcagcc ctggcaagta gtga 1524

<210> 8

<211> 160

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 8

Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr
1 5 10 15

Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met
20 25 30

Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu
35 40 45

Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala
50 55 60

Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile
65 70 75 80

Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
85 90 95

Gly Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln
100 105 110

Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu
115 120 125

Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val
130 135 140

Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys
145 150 155 160

<210> 9

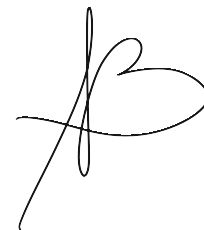
<211> 486

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polinucleotide
sintetico



<400> 9
gagaagaacc tctacctctc ctgctgtctg aaggacgaca agcccacact ccagctggag 60
tccgtggacc ccaagaacta cccaagaag aagatggaga agcggttcgt gttcaacaag 120
atcgagatca acaacaagct ggagttcgag agcgcccagt tcccactg gtacatttcc 180
acctcccagg ccgagaacat gccctcttt ctgggggaa ccaagggcgg ccaggacatc 240
accgacttca ccatgcagtt cgtctccagc ggaggaagcg gaggcagcgg agctcccggtg 300
aggagcctga actgcaccct gagggacagc cagcagaagt ccctggtgat gtccggacct 360
tacgaactga aggcctcca tctgcaagga caggatatgg agcagcaggt ggtgttctcc 420
atgtccttcg tccagggcga agagtccaac gacaagatcc ccgtggcctt gggcctgaaa 480
tagtga 486

<210> 10

<211> 397

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 10

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Ala Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser Ala Asn
35 40 45

Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His Lys Gly
50 55 60

Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser Thr Glu
65 70 75 80

Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe Val Pro
85 90 95

Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg Asn Ser
100 105 110

Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu Asn Glu
115 120 125

Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys Leu Pro
130 135 140

Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe Phe Lys
145 150 155 160

Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp Cys Lys
165 170 175

Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp Arg Leu
180 185 190

Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr Cys His
195 200 205

Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg Val Ile
210 215 220

Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Ser Gly Gly Ser Gly Asn Lys Leu
225 230 235 240

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln
245 250 255

Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp
260 265 270

Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285

Ser Gly Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln
290 295 300

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His
305 310 315 320

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe
325 330 335

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu
340 345 350

Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro
355 360 365

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys
370 375 380

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn
385 390 395

<210> 11

<211> 1197

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polinucleotide

sintetico

<400> 11

atggacgcta tgaagcgggg actgtgctgc gtgctcctgc tgtgcgggc tgtctttgtc 60
agcgcccggg actataagga cgatgatgac aaggacaagt gcaaggagcg ggaggagaag 120
atcatcctgg tgagctccgc caacgagatt gacgtccggc cctgccctct caacccccaac 180
gagcataagg gcaccatcac ctggtacaaa gacgacagca aaacaccgct ctccaccgag 240
caagcctccc ggattcacca gcacaaggag aagctctggt tcgtgcccgc taaggtggag 300
gattccggac actactactg tgtggtccgg aactccagct actgcctgag gattaagatc 360
agcgctaagt tcgtcgagaa cgagcccaac ctctgctaca atgccaggc catcttcaag 420
cagaagctcc ctgtggctgg agacggaggc ctggtctgcc cctacatgga gttcttcaag 480
aacgagaata acgagctgcc taagctgcag tggtaacaagg actgcaaacc cctgctcctc 540
gacaacatcc acttctccgg cgtcaaggac cggctgatcg tcatgaacgt ggccgagaag 600
cacaggggca actatacctg tcacgccagc tacacctacc tgggaaagca gtatcctatc 660
accaggggta ttgagttcat cacactcgag gaaaacagcg gcggcagcgg caacaagctg 720
gagttcgagt ccgccagtt tcctaactgg tacatctcca caagccaggc cgagaacatg 780
cctgtcttc tggcgccac caaaggcggc caagatatca ccgacttcac catgcagttt 840
gtgagctccg gaggtccgg aggaagcggg gctcctgtgc ggtccctgaa ttgcaccctg 900
cgggattccc aacagaagag cctggtgatg tccggcccct acgagctcaa ggccctccat 960
ctgcaaggcc aggacatgga gcagcaggtg gtcttcagca tgagcttcgt gcagggagag 1020
gagtccaacg ataagatccc cgtcgctctc ggactcaagg agaagaacct gtacctctcc 1080
tgcgtgctga aggacgataa gccaccctc cagctggaat ccgtggacc caagaactac 1140
cccaagaaaa aatggaaaa gcggtttgtc ttaacaaga tcgagattaa ctagtga 1197

<210> 12

<211> 539

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 12

Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
1 5 10 15

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
20 25 30

Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
35 40 45

Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
65 70 75 80

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
85 90 95

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
100 105 110

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
115 120 125

Asn Leu Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
130 135 140

Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu
145 150 155 160

Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
165 170 175

Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
180 185 190

Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
195 200 205

Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
210 215 220

Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
225 230 240

His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
245 250 255

Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly
260 265 270

Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr
275 280 285

His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Gly
290 295 300

Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
305 310 315 320

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
325 330 335

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
340 345 350

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
355 360 365

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
370 375 380

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
385 390 395 400

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
405 410 415

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
420 425 430

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
435 440 445

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
450 455 460

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
465 470 475 480

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
485 490 495

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
500 505 510

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
515 520 525

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
530 535

<210> 13

<211> 1623

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polinucleotide

sintetico

<400> 13

tccaagaact tccacctgag gcctcgggac ctgatctcca acatcaacgt gatcgtgctg 60
gaactgaagg gctccgagac aaccttcatg tgcgagtacg cgcagcagac agctaccatc 120
gtggaatttc tgaaccgggtg gatcaccttc tgccagtcca tcatctccac cctgaccggc 180
ggctcctcca gcaccaagaa aaccacagctg cagctggaac atctgctgct ggacctgcag 240
atgatcctga acggcatcaa caactacaag aacccaagc tgacctggat gctgaccttc 300
aagttctaca tgcccaagaa ggccaccgaa ctgaaacatc tgcagtgcct ggaagaagaa 360
ctgaagcccc tggagaggt gctgaacctg gctcagggat ctggcggcgg atctgagctg 420
tgcgacgacg accctcctga gatccctcac gccaccttca aggccatggc ttacaaagag 480
ggcaccatgc tgaactgcga gtgcaagaga ggcttccggc ggatcaagtc cggctccctg 540
tacaatgctg gcaccggcaa ctccagccac tcctcctggg acaaccagtg ccagtgcacc 600
tcctctgcca cccggaacac caccaacaa gtgaccccc agcccagagga acagaaagag 660
cgcaagacca ccgagatgca gtccccatg cagcctgtgg accaggcttc tctgcctggc 720
cactgcagag agcctccacc ttgggagaac gaggtaccg agagaatcta ccacttcgtc 780
gtgggccaga tgggtacta ccagtgcgtg cagggtacc gcgcctgca tagaggacct 840
gctgagtccg tgtgcaagat gaccacggc aagaccgggt ggaccagcc tcagctgac 900
tgtacagggc gcggaggctc cgagcetaag tcctccgata agaccacac ctgtcccccc 960
tgtcctgccc ctgaactgct gggaggccct tccgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag 1020
gacacctga tgatctcccg gacccccgaa gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtcccac 1080
gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac gtggacggcg tggagtgca caacgccaa 1140
accaagccca gagaggaaca gtacaactcc acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg 1200
ctgcaccagg attggctgaa tggcaaagag tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg 1260
ccagccccc tcaaaaagac catctccaag gccaaaggcc agccccggga accccaggtg 1320
tacacactgc ccctagccg ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc 1380
gtgaagggct tctaccctc cgatatcgcc gtggaatggg agtccaacgg ccagcctgag 1440
aacaattata agaccacccc ccctgtgctg gactccgacg gctcattctt cctgtacagc 1500
aagctgacag tggacaagtc ccgggtggcag caggccaacg tgttctcctg ctccgtgatg 1560
cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag aagtccctgt ccctgtctcc cggcaagtga 1620
tga 1623

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 14

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 15

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 16

<211> 2

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 16

Gly Gly
1

<210> 17

<211> 2

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

B

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 17

Met Gly
1

<210> 18

<211> 3

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Peptide sintetico

<400> 18

Met Gly Gly
1

<210> 19

<211> 269

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Ala Glu Val Pro Glu Leu Ala Ser Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Gly Asn Glu Asp Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Gly Pro Lys Gln Met
20 25 30

Lys Cys Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Cys Pro Leu Asp Gly Gly Ile
35 40 45

Gln Leu Arg Ile Ser Asp His His Tyr Ser Lys Gly Phe Arg Gln Ala
50 55 60

Ala Ser Val Val Val Ala Met Asp Lys Leu Arg Lys Met Leu Val Pro
65 70 75 80

Cys Pro Gln Thr Phe Gln Glu Asn Asp Leu Ser Thr Phe Phe Pro Phe
85 90 95
Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Phe Phe Asp Thr Trp Asp Asn Glu Ala
100 105 110

Tyr Val His Asp Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp
115 120 125

Ser Gln Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala
130 135 140

Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met
145 150 155 160

Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu
165 170 175

Gly Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp
180 185 190

Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys
195 200 205

Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn
210 215 220

Lys Leu Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr
225 230 235 240

Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly
245 250 255

Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
260 265

<210> 20

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 21

<211> 918

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Val Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu
1 5 10 15

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
115 120 125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
130 135 140

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
165 170 175

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
180 185 190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
195 200 205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
210 215 220

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
225 230 235 240

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys
245 250 255

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
260 265 270

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
275 280 285

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu
290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile
305 310 315 320

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile
325 330 335

Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val
355 360 365

Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala

Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
625 630 635 640

Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
645 650 655

Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
660 665 670

Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
675 680 685

Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
690 695 700

Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
705 710 715 720

Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
725 730 735

Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
740 745 750

Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
755 760 765

His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
770 775 780

Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
785 790 795 800

His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
805 810 815

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
820 825 830

Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu
835 840 845

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln
850 855 860

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly
865 870 875 880

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala
885 890 895

Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln
900 905 910

Gly Gly Tyr Met Pro Gln
915

<210> 22

<211> 569

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Lys Val Leu Leu Arg Leu Ile Cys Phe Ile Ala Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15

Ser Leu Glu Ala Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu
20 25 30

Val Ser Ser Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro
35 40 45

Asn Glu His Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr
50 55 60

Pro Val Ser Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys
65 70 75 80

Leu Trp Phe Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Phe Val Glu Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe
115 120 125

Lys Gln Asn Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr
130 135 140

Met Glu Phe Phe Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp
145 150 155 160

Tyr Lys Asp Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly
165 170 175

Val Lys Asp Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly
180 185 190

Asn Tyr Thr Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro
195 200 205

Ile Thr Arg Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr
210 215 220

Arg Pro Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu
225 230 235 240

Gly Ser Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro
260 265 270

Val Leu Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg
275 280 285

Arg Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg
290 295 300

Phe Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile
305 310 315 320

Asp Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys
325 330 335

His Met Ile Gly Ile Cys Val Thr Leu Thr Val Ile Ile Val Cys Ser
340 345 350

Val Phe Ile Tyr Lys Ile Phe Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg
355 360 365

Asp Ser Cys Tyr Asp Phe Leu Pro Ile Lys Ala Ser Asp Gly Lys Thr
370 375 380

Tyr Asp Ala Tyr Ile Leu Tyr Pro Lys Thr Val Gly Glu Gly Ser Thr
385 390 395 400

Ser Asp Cys Asp Ile Phe Val Phe Lys Val Leu Pro Glu Val Leu Glu
405 410 415

Lys Gln Cys Gly Tyr Lys Leu Phe Ile Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val
420 425 430

AB

Gly Glu Asp Ile Val Glu Val Ile Asn Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg
435 440 445

Arg Leu Ile Ile Ile Leu Val Arg Glu Thr Ser Ser Phe Ser Trp Leu
450 455 460

Gly Gly Ser Ser Glu Glu Gln Ile Ala Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln
465 470 475 480

Asp Gly Ile Lys Val Val Leu Leu Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr
485 490 495

Glu Lys Met Pro Glu Ser Ile Lys Phe Ile Lys Gln Lys His Gly Ala
500 505 510

Ile Arg Trp Ser Gly Asp Phe Thr Gln Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr
515 520 525

Arg Phe Trp Lys Asn Val Arg Tyr His Met Pro Val Gln Arg Arg Ser
530 535 540

Pro Ser Ser Lys His Gln Leu Leu Ser Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu
545 550 555 560

Gln Arg Glu Ala His Val Pro Leu Gly
565

<210> 23

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val
1 5 10 15

Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro
20 25 30

His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn
35 40 45

Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr
50 55 60

Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys
65 70 75 80
Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Lys Gln Val Thr Pro
85 90 95

Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro
100 105 110

Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val
130 135 140

Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His
145 150 155 160

Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg
165 170 175

Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln
180 185 190

Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu
195 200 205

Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr
210 215 220

Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln
225 230 235 240

Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu
245 250 255

Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile
260 265 270

<210> 24

<211> 142

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 24

Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
1 5 10 15

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
20 25 30

Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
35 40 45

Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
65 70 75 80

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
85 90 95

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
100 105 110

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
115 120 125

Asn Leu Ala Gln Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
130 135 140

<210> 25

<211> 539

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 25

Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
1 5 10 15

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
20 25 30

Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
35 40 45

Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
65 70 75 80

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
85 90 95

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
100 105 110

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
115 120 125

Asn Leu Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
130 135 140

Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu
145 150 155 160

Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
165 170 175

Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
180 185 190

Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
195 200 205

Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
210 215 220

Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
225 230 235 240

His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
245 250 255

Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly
260 265 270

Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr
275 280 285

His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Gly
290 295 300

Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
305 310 315 320

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
325 330 335

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

340 345 350

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
355 360 365

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
370 375 380

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
385 390 395 400

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
405 410 415

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
420 425 430

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
435 440 445

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
450 455 460

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
465 470 475 480

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
485 490 495

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
500 505 510

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
515 520 525

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
530 535

<210> 26

<211> 311

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 26

Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
1 5 10 15

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
20 25 30

Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
35 40 45

Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
65 70 75 80

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
85 90 95

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
100 105 110

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
115 120 125

Asn Leu Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
130 135 140

Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu
145 150 155 160

Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
165 170 175

Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
180 185 190

Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
195 200 205

Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
210 215 220

Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
225 230 235 240

His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
245 250 255

Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly

260

265

270

Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr
275 280 285

His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Asp
290 295 300

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
305 310

<210> 27

<211> 418

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide

sintetico

<400> 27

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

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

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro
225 230 235 240

Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr
245 250 255

Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly
260 265 270

Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala
275 280 285

His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Gly Gly Ser Glu
290 295 300

Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile
305 310 315 320

Val Gln Met Phe Ile Asn Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile
325 330 335

Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp
340 345 350

Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr
355 360 365

Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser
370 375 380

Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala
385 390 395 400

Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys
405 410 415

Glu Cys

<210> 28

<211> 194

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale: Polipeptide
sintetico

<400> 28

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro
1 5 10 15

Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr
20 25 30

Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly
35 40 45

Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala
50 55 60

His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Gly Gly Ser Glu
65 70 75 80

Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile
85 90 95

Val Gln Met Phe Ile Asn Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile
100 105 110

Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp
115 120 125

Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr
130 135 140

Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser
145 150 155 160

Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala
165 170 175

Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys
180 185 190

Glu Cys

RIVENDICAZIONI

1. Polipeptide di fusione comprendente gli amminoacidi 1-303 di SEQ ID NO: 26.
2. Polipeptide di fusione secondo la rivendicazione 1 costituito dagli amminoacidi 1-303 di SEQ ID NO: 26.
3. Composizione farmaceutica comprendente il polipeptide di fusione secondo la rivendicazione 1 o 2 e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.
4. Acido nucleico isolato o ricombinante che codifica per il polipeptide di fusione secondo la rivendicazione 1 o 2.
5. Vettore ricombinante comprendente l'acido nucleico secondo la rivendicazione 4.
6. Cellula ospite comprendente il vettore secondo la rivendicazione 5.
7. Polipeptide di fusione secondo la rivendicazione 1 o 2 o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3 per l'uso in medicina.
8. Polipeptide di fusione secondo la rivendicazione 1 o 2 o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3 per l'uso in un metodo terapeutico per agonizzare selettivamente IL-2R $\beta\gamma$ su una cellula, in cui il metodo comprende porre in contatto la cellula con il polipeptide di fusione secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2 o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3.
9. Polipeptide di fusione o composizione farmaceutica per

l'uso secondo la rivendicazione 8, in cui il polipeptide di fusione o la composizione farmaceutica è posto/a in contatto in maniera extracorporea con la cellula.

10. Polipeptide di fusione secondo la rivendicazione 1 o 2 o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3 per l'uso nel trattamento del cancro.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLA 1/12

Figura 1

“IL6 signaling Hexameric complex” = Complesso esamerico di trasmissione del segnale di IL6

“Side view” = Vista laterale

“Top view” = Vista dall’alto

TAVOLA 2/12

Figura 2

“Circular permutation IL6” = Permutazione circolare di IL6

“Circular permutation” = Permutazione circolare

TAVOLA 3/12

Figura 3

“RDB1527 (picasso3_D1) and RBD1529 (wtIL6_D1)” = RDB1527 (picasso3_D1) e RBD1529 (wtIL6_D1)

Figura 4

“Absorbance” = Assorbanza

“IL6 dose” = Dose di IL6

“RDB1503 dose” = Dose di RDB1503

“Concentration” = Concentrazione

TAVOLA 4/12

Figura 5

“Absorbance” = Assorbanza

“IL6 dose” = Dose di IL6

“RDB1529 dose + 250pg/ml IL6” = dose di RDB1529 + 250pg/ml di IL6

“RDB1527 dose + 250pg/ml IL6” = dose di RDB1527 + 250pg/ml di IL6

“Concentration” = Concentrazione

TAVOLE 5-6/12

Figure 6A-6C

“Response” = Risposta

“Time” = Tempo

“Raw data” = Dati grezzi

“Fit” = Interpolazione

TAVOLA 8/12

Figura 8

“IL-2R Native Termini” = Terminali nativi di IL-2R

TAVOLA 9/12

Figura 9

“IL-1 Family” = Famiglia di IL-1

“FGF Family” = Famiglia di FGF

“4-Helix Bundle Cytokines” = Citochine a fascio di 4 eliche

TAVOLA 10/12

Figura 11A

“Mean BL1” = BL1 medio

“HH - pSTAT5 FACS” = FACS di HH - pSTAT5

“Proleukin” = Proleuchina

“Concentration” = Concentrazione

Figura 11B

“Fluorescence 560,590” = Fluorescenza 560,590

“CTLL-2 Proliferation assay” = Saggio di proliferazione CTLL-2



“Concentration” = Concentrazione

TAVOLA 11/12

Figura 12A

“Mean BL1” = BL1 medio

“HH - pSTAT5 FACS” = FACS di HH - pSTAT5

“wt IL-15” = IL-15 wt

“Concentration” = Concentrazione

Figura 12B

“Fluorescence 560,590” = Fluorescenza 560,590

“CTLL-2 Proliferation” = Proliferazione di CTLL-2

“wt IL-15” = IL-15 wt

“Concentration” = Concentrazione

TAVOLA 12/12

Figura 13

“Spacer” = Spaziatore

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

IL6 signaling Hexameric complex

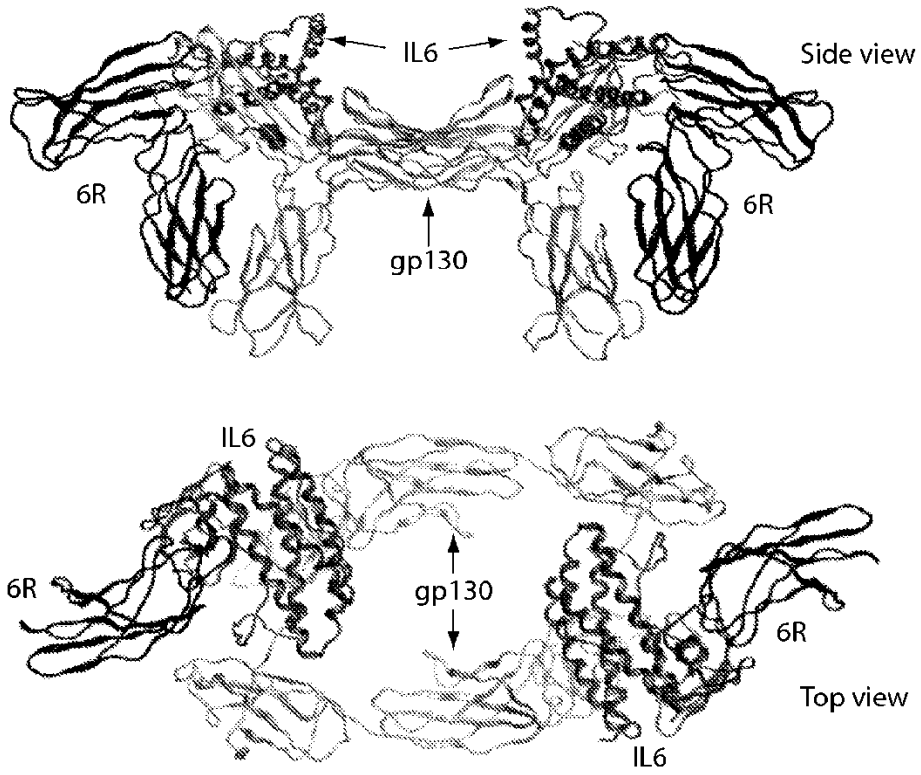


Fig. 1

RDB1527 (picasso3_D1) and RDB1529 (wtL6_D1)

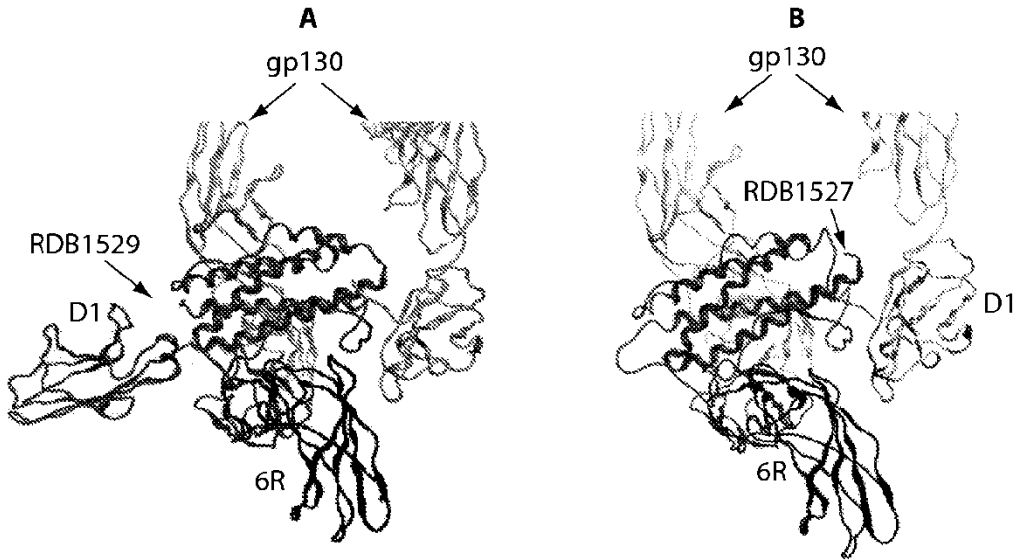


Fig. 3

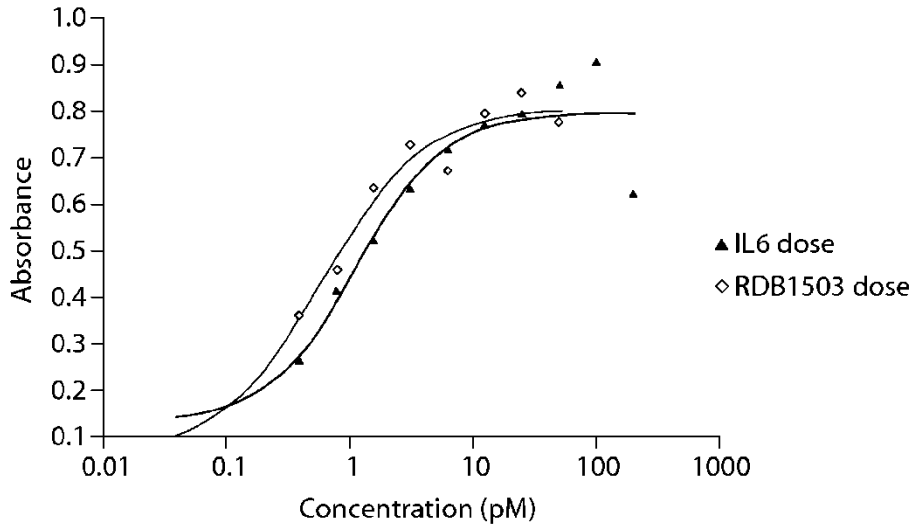


Fig. 4

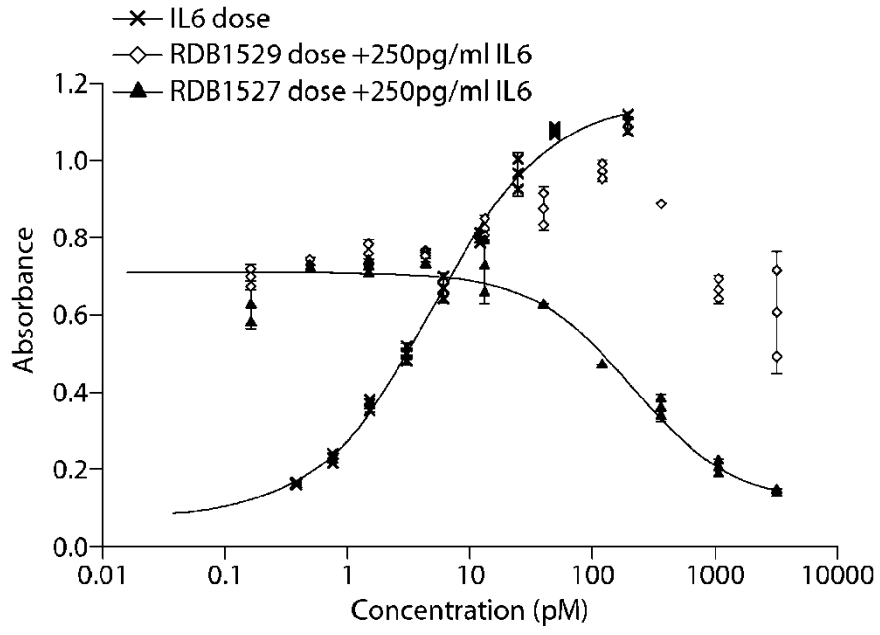


Fig. 5

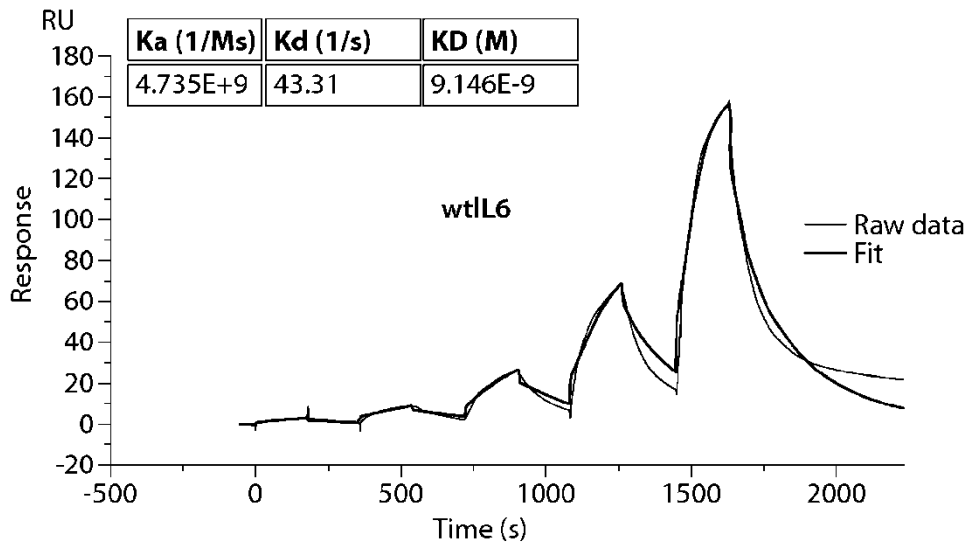


Fig. 6A

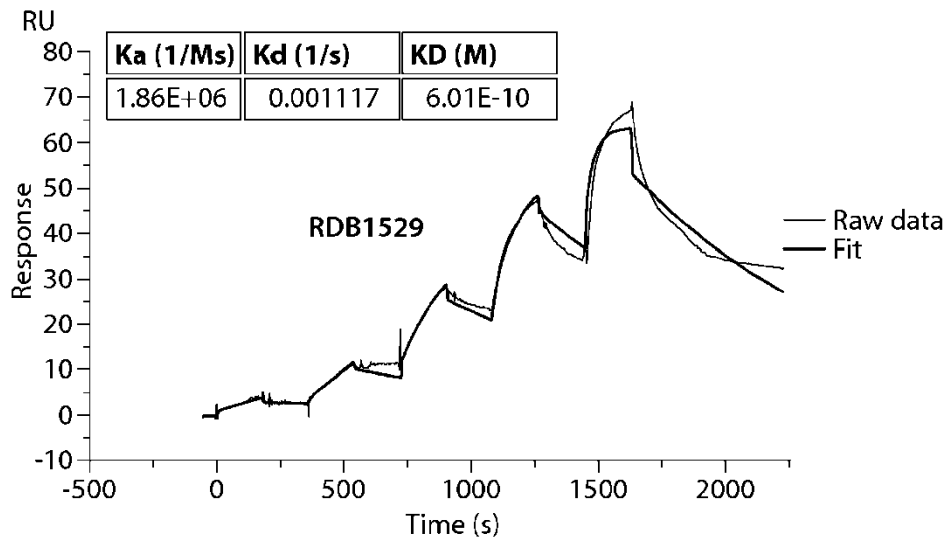


Fig. 6B

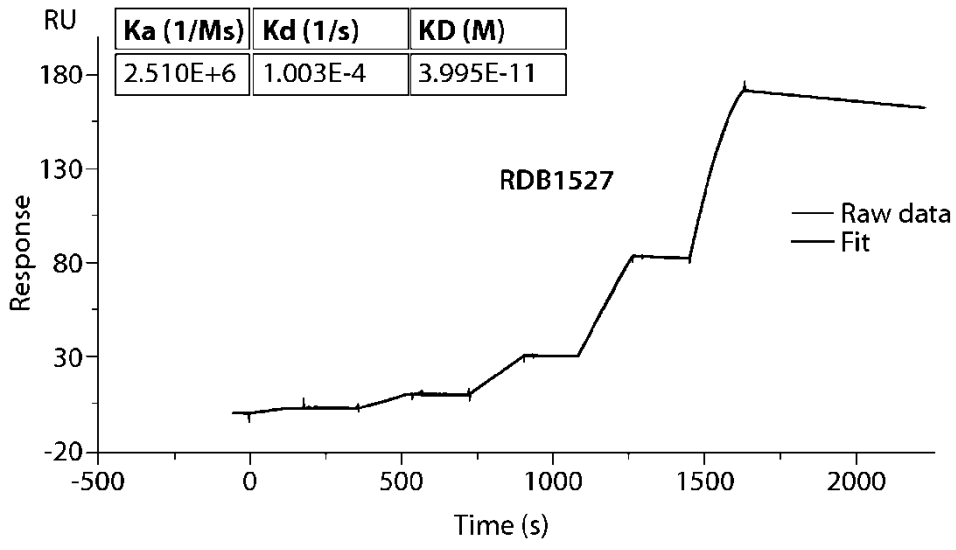


Fig. 6C

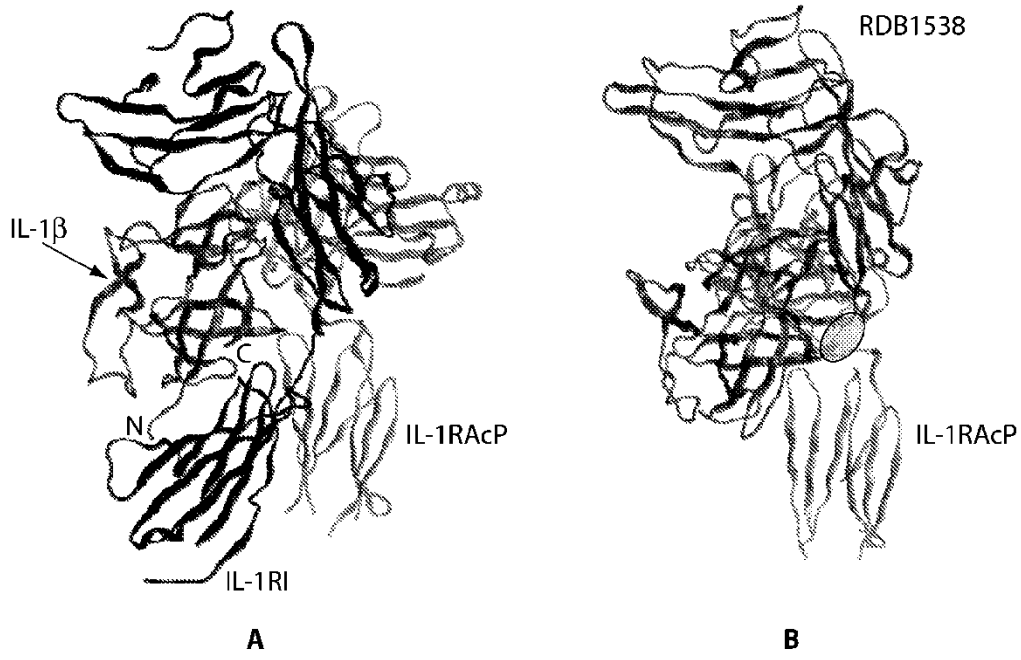


Fig. 7

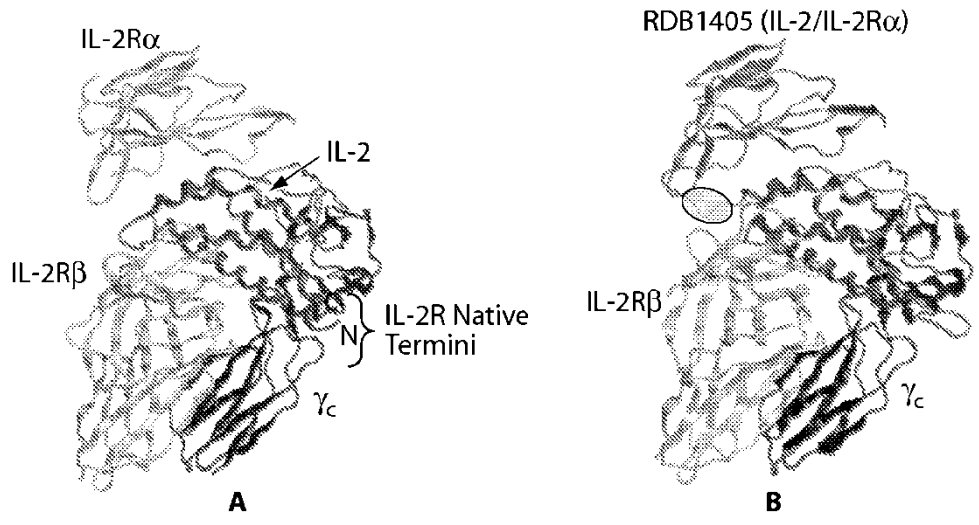


Fig. 8

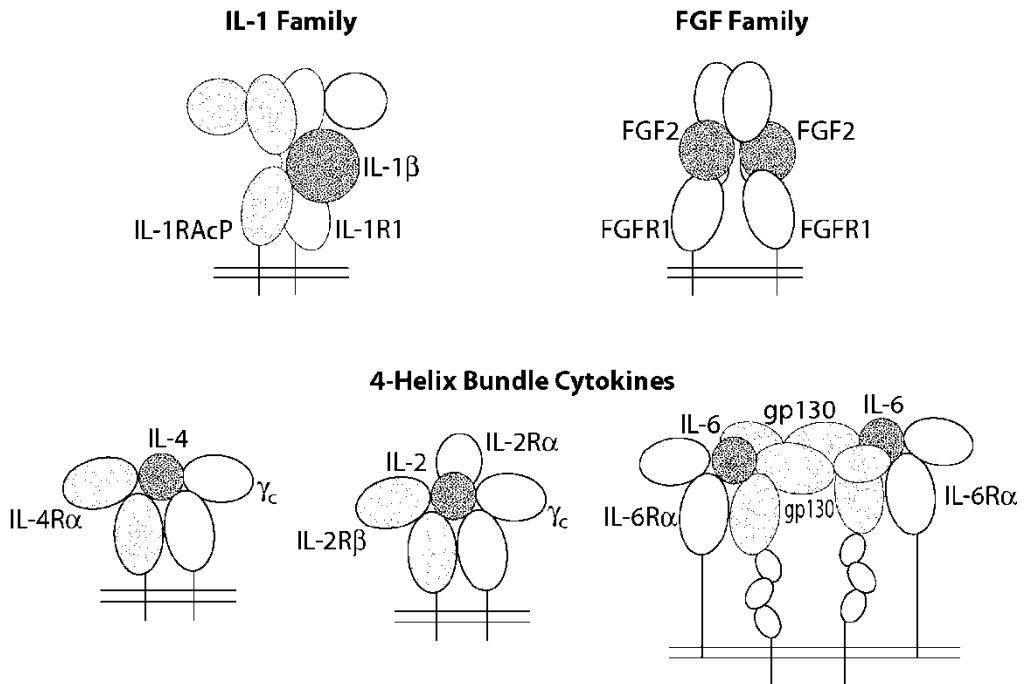


Fig. 9

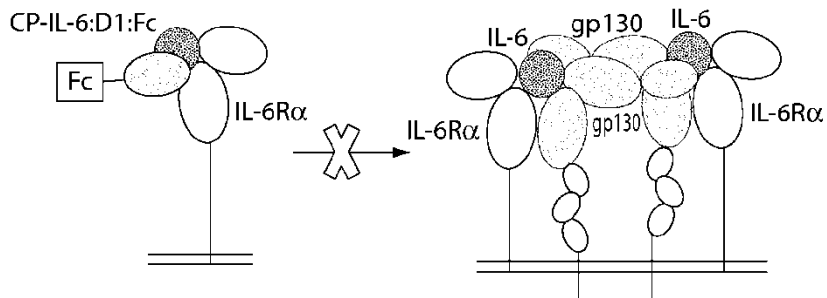


Fig. 10

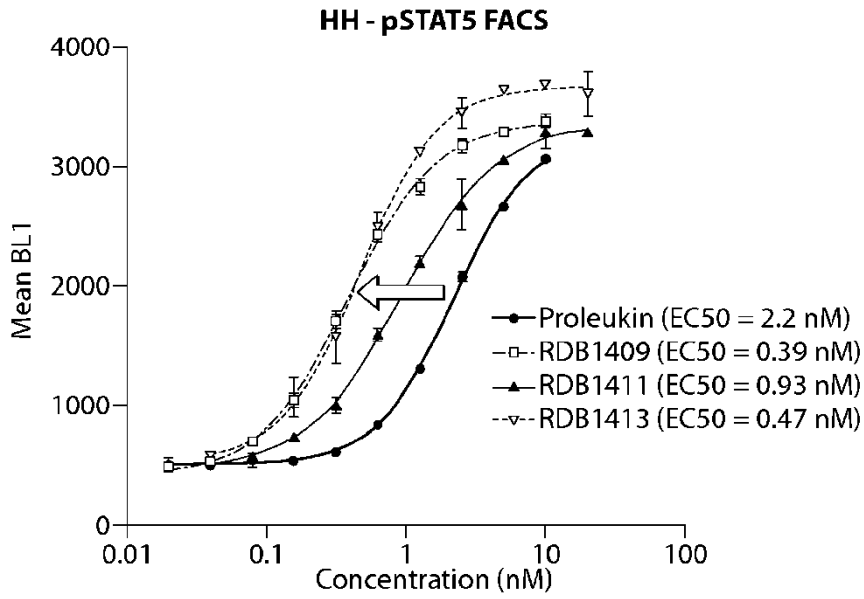


Fig. 11A

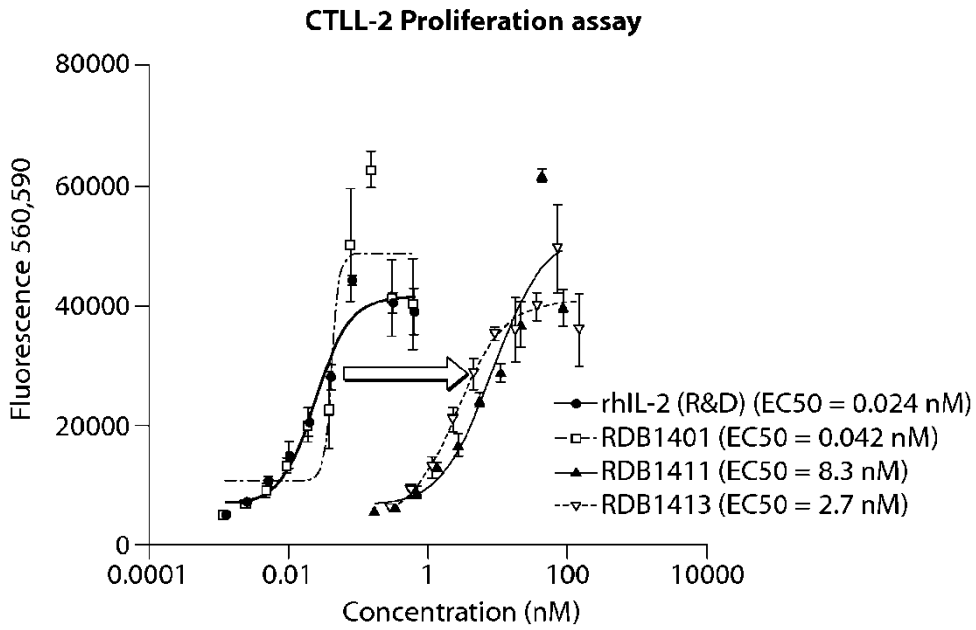


Fig. 11B

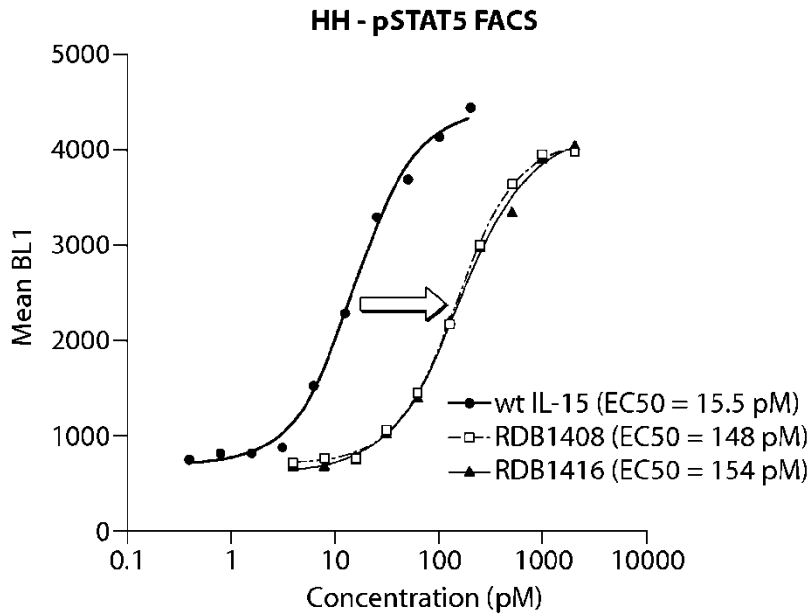


Fig. 12A

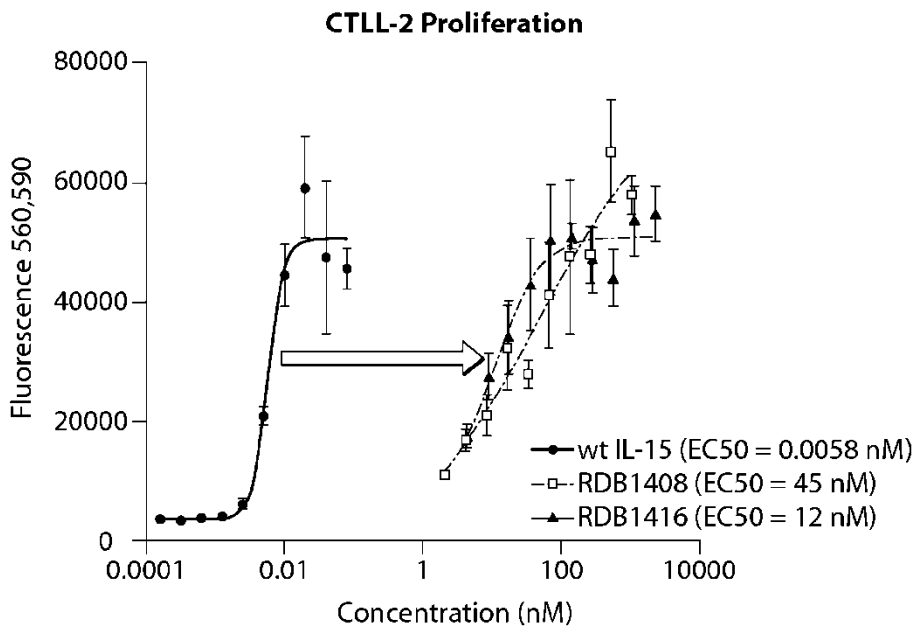


Fig. 12B

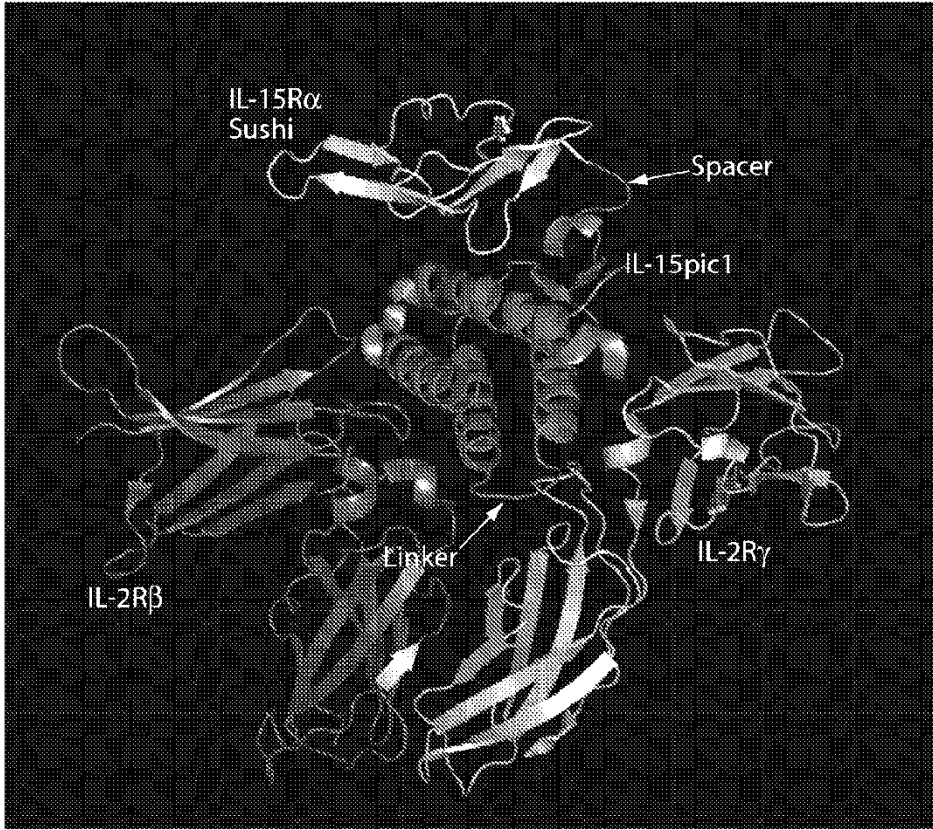


Fig. 13