

SIB EX6050R

P071516SM:CJM/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° 14795041.4, pubblicazione n° 2981822

a nome di Scholar Rock, Inc.

di 620 Memorial Drive, 2nd Floor, Cambridge, Massachusetts 02139, U.S.A.

“COMPOSIZIONI E METODI PER LA MODULAZIONE DI FATTORE DI CRESCITA”

Jacopo de Benedetti  
USBM-043R B

## DESCRIZIONE

### **CAMPO DELL'INVENZIONE**

Forme di realizzazione della presente invenzione possono includere proteine ricombinanti come pure anticorpi diretti verso tali proteine. In alcune forme di realizzazione, tali proteine ed anticorpi possono essere correlati al campo della biologia dei membri della famiglia del TGF- $\beta$ .

### **FONDAMENTO DELL'INVENZIONE**

Le molecole di segnalazione cellulare stimolano una varietà di attività cellulari. Tale segnalazione è spesso strettamente regolata, spesso attraverso interazioni con altre biomolecole, la matrice extracellulare e/o cellulare o all'interno di un particolare ambiente o nicchia cellulare. Tali interazioni possono essere dirette o indirette.

Cascade di segnalazione cellulare sono implicate in un certo numero di diversi pathway biologici includenti, ma non limitati a modulazione della crescita cellulare, modulazione dell'omeostasi dei tessuti, dinamica della matrice extracellulare (ECM), modulazione della migrazione cellulare, invasione e immunomodulazione/soppressione. In alcuni casi, le proteine implicate nella segnalazione cellulare vengono sintetizzate e/o vengono sequestrate in forma latente, richiedendo uno stimolo di qualche tipo per partecipare agli eventi di segnalazione. Rimane la necessità nella tecnica di agenti, strumenti e metodi per la modulazione di segnalazione cellulare e/o di attività cellulari.

US 2011/053221 A1 (Chen et al). descrive sistemi di espressione per produrre autentiche proteine umane ricombinanti. Biswas et al. in *J Clin Invest*, vol. 117, no. 5, Maggio 2007 (2007-05), pagine 1305-1313, descrivono l'uso di un anticorpo pan-TGF- $\beta$  (2G7) neutralizzante che lega TGF- $\beta$  maturo libero solo dopo il suo rilascio dal complesso latente.

### **SOMMARIO DELL'INVENZIONE**

L'invenzione fornisce un anticorpo in grado di legare un antigene ricombinante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1 o un complesso fattore di crescita-prodominio (GPC) che comprende SEQ ID NO: 38; in cui detto anticorpo modula il rilascio di TGF- $\beta$ 1 da un GPC; in cui facoltativamente detto antigene ricombinante è un complesso proteico comprendente: i.) una proteina selezionata dal gruppo costituito da proteina legante il TGF- $\beta$  latente 1S (LTBP1S), ripetizioni predominanti della glicoproteina A (GARP), LTBP1, LTBP2,

LTBP3, LTBP4, fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3, fibrillina-4, contenente ripetizioni ricche in leucina (LRRC33), perlecano, decorina, elastina e collagene, e/o ii.) una proteina comprendente una o più sequenze amminoacidiche selezionate dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 156, 159, 143-155, 157, 158, 160, 161, 286-294 e una combinazione o un frammento delle stesse.

L'invenzione fornisce inoltre il suddetto anticorpo, per uso in un metodo di modulazione di attività di un fattore di crescita in un sistema biologico comprendente mettere a contatto detto sistema biologico con l'anticorpo.

L'invenzione fornisce inoltre una composizione farmaceutica comprendente il suddetto anticorpo ed almeno un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

L'invenzione fornisce inoltre un kit comprendente la suddetta composizione farmaceutica e istruzioni per l'uso della stessa.

L'invenzione fornisce inoltre un metodo di generazione del suddetto anticorpo, in cui l'anticorpo viene preparato utilizzando un antigene ricombinante comprendente SEQ ID NO: 1 o un suo frammento, o un antigene ricombinante comprendente un complesso fattore di crescita-prodominio (GPC) che comprende SEQ ID NO: 38.

L'invenzione fornisce inoltre un metodo di generazione di un anticorpo che modula il rilascio di TGF- $\beta$ 1 da un complesso fattore di crescita-prodominio (GPC) comprendente i passi di: a) selezionare un anticorpo da un pool di due o più anticorpi candidati in base alla capacità di associarsi con un antigene, in cui l'antigene comprende un GPC, che comprende un prodominio di TGF- $\beta$ 1 e un fattore di crescita TGF- $\beta$ 1; e b) selezionare un anticorpo dal pool di due o più anticorpi candidati in base alla capacità di modulare livelli e/o attività del fattore di crescita TGF- $\beta$ 1.

In alcuni casi, la presente descrizione fornisce proteine ricombinanti comprendenti una o più proteine correlate a TGF- $\beta$  comprendenti uno o più moduli proteici selezionati dal gruppo costituito da complessi fattore di crescita prodominio (GPC), peptidi associati a latenza (LAP), domini LAP-simili, "regioni camicia di forza", domini di fattore di crescita, "regioni gancio", regioni sito di clivaggio per la furina, "regioni braccio", "regioni dita", regioni N-terminali per le associazioni extracellulari, loop di latenza, regioni elicoidali alfa 1, regioni elicoidali alfa 2, regioni di sequenza RGD, "regioni loop di innesco" e "regioni cravatta a farfalla". In alcuni casi, proteine

ricombinanti della presente descrizione possono comprendere uno o più moduli proteici da una specie di vertebrato. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere uno o più moduli proteici comprendenti una o più mutazioni. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere una o più mutazioni comprendenti una o più regioni di sito di clivaggio per furina. In alcuni casi, tali mutazioni possono impedire il clivaggio enzimatico delle proteine ricombinanti della presente descrizione. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere una o più mutazioni comprendenti una mutazione della sequenza amminoacidica RXXR nella sequenza amminoacidica RXG. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere una o più mutazioni comprendenti una mutazione della sequenza amminoacidica RXXR nella sequenza amminoacidica AXXA. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere una o più mutazioni comprendenti le regioni N-terminali per le associazioni extracellulari. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere una o più mutazioni comprendenti sostituzione e/o delezione di almeno un residuo di cisteina presente all'interno di circa i primi 4, 5, 6 o 7 residui amminoacidici N-terminali. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere una o più sostituzioni di almeno un residuo di cisteina con almeno un residuo di serina.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono essere complessate con una proteina selezionata dal gruppo costituito da LTBP1, LTBP1S, LTBP2, LTBP3, LTBP4, fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3, fibrillina-4, GARP, LRRC33 e una combinazione o un frammento delle stesse. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere uno o più marcatori rivelabili. Tali marcatori rivelabili possono comprendere marcatori biotina, tag poliistidina e/o flag tag.

In alcuni casi, la presente descrizione fornisce proteine chimeriche comprendenti uno o più moduli proteici da almeno due proteine correlate a TGF- $\beta$  in cui detti moduli proteici possono essere selezionati dal gruppo costituito da complessi fattore di crescita-prodominio (GPC), peptidi associati a latenza (LAP), domini LAP-simili, "regioni camicia di forza", domini di fattore di crescita, "regioni gancio", regioni sito di clivaggio per furina, "regioni braccio", "regioni dita", regioni N-terminali per le associazioni extracellulari, loop di latenza, regioni elicoidali

alfa 1, regioni di sequenza RGD, “regioni loop di innesco”, “regioni cravatta a farfalla” e qualunque di quelli elencati nelle Tabelle 2, 3 e 11. In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere uno o più moduli proteici selezionati da una o più specie di vertebrato. In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere GPC. In alcuni casi, tali GPC possono comprendere almeno un LAP o un dominio LAP-simile da un membro della famiglia del TGF- $\beta$  e almeno un dominio di fattore di crescita da un membro della famiglia del TGF- $\beta$  in cui il LAP o il dominio LAP-simile e il dominio di fattore di crescita sono da differenti membri della famiglia del TGF- $\beta$ . In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere almeno un LAP o un dominio LAP-simile e almeno un dominio di fattore di crescita, ognuno dei quali è selezionato dal gruppo costituito da TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, GDF-8, GDF-11 e inibina beta A. In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere uno o più GPC in cui almeno una regione N-terminale è da un membro della famiglia del TGF- $\beta$ , almeno una regione C-terminale è da un membro della famiglia del TGF- $\beta$  e in cui la regione N-terminale e la regione C-terminale sono da membri della famiglia del TGF- $\beta$  differenti. In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere almeno una regione N-terminale e almeno una regione C-terminale selezionate da regioni terminali del TGF- $\beta$ 1, regioni terminali del TGF- $\beta$ 2, regioni terminali del TGF- $\beta$ 3, regioni terminali del GDF-8, regioni terminali del GDF-11 e regioni terminali dell’inibina beta A. In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere un GPC da almeno un membro della famiglia del TGF- $\beta$  comprendente almeno una “regione braccio” da un membro della famiglia del TGF- $\beta$  differente. In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere un GPC comprendente almeno un membro della famiglia del TGF- $\beta$  comprendente almeno una “regione loop di innesco” da un membro della famiglia del TGF- $\beta$  differente. In alcuni casi, la proteina chimerica della presente descrizione può comprendere qualunque delle combinazioni di moduli proteici elencati nella Tabella 12.

In alcuni casi, la proteina chimerica della presente descrizione può essere complessata con una proteina selezionata dal gruppo costituito da LTBP1, LTBP1S, LTBP2, LTBP3, LTBP4, fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3, fibrillina-4, GARP e LRRC33 e una combinazione o un frammento delle stesse. In alcuni casi, le proteine chimeriche della

presente descrizione possono comprendere uno o più marcatori rivelabili. In alcuni casi, tali marcatori rivelabili possono comprendere almeno un marcatore biotina, un tag poliistidina e/o un flag tag.

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce un anticorpo come definito sopra. In alcune forme di realizzazione, tali anticorpi comprendono anticorpi monoclonali. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione sono sostanzialmente isolati. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi monoclonali della presente invenzione sono anticorpi di stabilizzazione. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi di stabilizzazione della presente invenzione riducono il livello di fattore di crescita libero rispetto al livello di fattore di crescita associato con uno o più GPC. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi di stabilizzazione possono ridurre la segnalazione cellulare dipendente da fattore di crescita. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi monoclonali della presente invenzione possono comprendere anticorpi di rilascio. Tali anticorpi possono aumentare il livello di fattore di crescita libero rispetto al livello di fattore di crescita associato con uno o più GPC. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi di rilascio della presente invenzione possono aumentare la segnalazione cellulare dipendente da fattore di crescita.

In alcuni casi, la presente descrizione fornisce composizioni comprendenti una o più di qualunque delle proteine ricombinanti, una o più di qualunque delle proteine chimeriche e/o uno o più di qualunque degli anticorpi descritti nella presente combinati con almeno un eccipiente.

In alcuni casi, la presente descrizione fornisce metodi di modulazione del livello di fattore di crescita libero in un soggetto o in una nicchia cellulare comprendenti l'uso di una o più composizioni descritte nella presente. In alcuni tali metodi, viene modulato il livello di segnalazione di fattore di crescita.

In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce metodi per selezionare un anticorpo desiderato comprendenti l'uso di uno o più saggi, in cui tali saggi comprendono una o più proteine ricombinanti della descrizione. Alcuni tali metodi comprendono i passi di 1) fornire un saggio di legame di anticorpo, 2) mettere a contatto il saggio di legame con uno o più anticorpi candidati, 3) ottenere dati di legame correlati all'affinità degli anticorpi candidati per l'una o più proteine ricombinanti e 4) selezionare un anticorpo desiderato in base ai dati di legame. I saggi di legame secondo tali metodi possono includere un saggio di immunoassorbente legato ad un

enzima (ELISA) e/o un saggio basato su selezione cellulare associata a fluorescenza (FACS). In alcuni casi, le proteine ricombinanti di tali saggi possono essere complessate con una proteina selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 153-161 e 286-292 o complessate con una proteina selezionata dal gruppo costituito da LTBP1, LTBP1S, LTBP2, LTBP3, LTBP4, fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3, fibrillina-4, GARP, LRRC33, perlecano, decorina, elastina e collagene. In alcuni casi, le proteine ricombinanti possono comprendere una proteina chimerica comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito dalle SEQ ID NO: 199-236 e 273.

Altri metodi di selezione di un anticorpo desiderato possono comprendere i passi di 1) fornire un saggio di attività di fattore di crescita, 2) mettere a contatto il saggio di attività di fattore di crescita con uno o più anticorpi candidati, 3) ottenere dati di attività di fattore di crescita e 4) selezionare un anticorpo desiderato in base ai dati di attività di fattore di crescita. I saggi di attività di fattore di crescita secondo tali metodi possono comprendere saggi basati su cellule selezionati dal gruppo costituito da saggi basati su luciferasi e saggi di proliferazione. Tali saggi basati su cellule possono comprendere una o più cellule di espressione che esprimono una o più proteine ricombinanti della descrizione o un complesso delle stesse. Tali saggi possono inoltre comprendere una o più cellule rispondenti che danno dati di espressione genica e/o dati di vitalità.

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce composizioni farmaceutiche comprendenti gli anticorpi come definiti sopra ed almeno un eccipiente farmaceutico.

Alcune composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattamento di un'indicazione correlata a TGF- $\beta$  in un soggetto comprendente mettere a contatto detto soggetto con una composizione dell'invenzione. Indicazioni correlate a TGF- $\beta$  possono includere indicazioni fibrotiche (ad esempio fibrosi polmonare, fibrosi renale, fibrosi epatica, fibrosi cardiovascolare, fibrosi cutanea, e fibrosi del midollo osseo), mielofibrosi, cancro o condizioni correlate a un cancro (ad esempio cancro del colon, cancro del rene, cancro della mammella, melanoma maligno e glioblastoma) e disordini e/o danni muscolari [ad esempio cachessia, distrofia muscolare, malattia polmonare ostruttiva cronica (BPCO), malattia del motoneurone, trauma, malattia neurodegenerativa, infezione, artrite reumatoide, immobilizzazione, sarcopenia, miosite da corpi di inclusione e diabete.]

In alcune forme di realizzazione, l'invenzione fornisce un kit comprendente una composizione dell'invenzione e

istruzioni per l'uso della stessa.

### **BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE**

Il precedente ed altri obiettivi, caratteristiche e vantaggi saranno evidenti dalla seguente descrizione di particolari forme di realizzazione dell'invenzione, come illustrate nei disegni allegati. I disegni non sono necessariamente in scala, essendo invece posta enfasi sull'illustrazione dei principi delle varie forme di realizzazione dell'invenzione.

La Figura 1 è un diagramma dell'albero della superfamiglia del TGF-beta, dove la divergenza è proporzionale alla lunghezza del ramo.

La Figura 2 è una rappresentazione schematica di una forma di realizzazione di una rappresentazione lineare di un monomero di fattore di crescita tradotto. In tali forme di realizzazione, i fattori di crescita tradotti possono comprendere peptidi segnale di secrezione, prodomini e domini di fattore di crescita. In forme di realizzazione secondo la forma di realizzazione qui rappresentata, i fattori di crescita tradotti possono comprendere anche un sito di clivaggio tra le regioni del prodominio e del fattore di crescita.

La Figura 3 è una rappresentazione schematica di una forma di realizzazione di un complesso fattore di crescita-prodominio (GPC) come pure una forma di realizzazione di un dimero di fattore di crescita libero e un dimero di peptide associato a latenza (LAP) libero. La freccia indica la capacità delle proteine secondo questa forma di realizzazione di cambiare tra le forme libere e complessate.

La Figura 4 è una rappresentazione schematica di una forma di realizzazione di un dimero di LAP libero e un dimero di fattore di crescita libero con le caratteristiche e/o i moduli proteici indicati.

La Figura 5 è una rappresentazione schematica di una forma di realizzazione di un GPC ricombinante.

La Figura 6 è una rappresentazione schematica di forme di realizzazione di GPC ricombinanti mutanti.

La Figura 7 rappresenta rappresentazioni schematiche di cinque proteine ricombinanti da sole o in complesso con LTBP o GARP

La Figura 8 mostra l'allineamento in base alla struttura tra proteine membri della famiglia del TGF- $\beta$  [adattato da Shi et al (Shi, M. et al., *Latent TGF- $\beta$  structure and activation*. Nature. 2011 Jun 15; 474(7351):343-9] Residui di cisteina richiesti per l'interazione con LTBP e/o GARP sono incorniciati. Residui mutati nella sindrome di

Camurati-Engelmann sono indicati con una stella. Siti di clivaggio per proteasi sono indicati con una freccia verso l'alto. Moduli proteici ed elementi di struttura secondaria sono indicati con barre piene. Residui sottolineati in corrispondenza del N-terminale di GDF-8 corrispondono ai siti di processamento del peptide segnale predetti in alternativa. "Punti di rottura di moduli chimerici" indicano regioni dove le caratteristiche strutturali sono conservate e forniscono moduli per la costruzione di proteine chimeriche (scambio di moduli tra membri della famiglia) in tutti i membri della famiglia. Le regioni N-terminali sono mostrate in (A), le regioni interne sono mostrate in (B) e le regioni C-terminali sono mostrate in (C).

Le Figure da 9A a C presentano 3 tabelle che mostrano la percentuale di identità tra sequenze amminoacidiche trovate nella famiglia del TGF- $\beta$ . La Figura 9A dimostra la percentuale di identità tra le proproteine (prodromio e fattore di crescita.) La percentuale di identità tra domini di fattore di crescita è presentata nella Figura 9B mentre la percentuale di identità tra prodromi è presentata nella Figura 9C.

La Figura 10 presenta un allineamento condotto tra GDF-8 (miostatina,) GDF-11, Inibina A e un dimero di GDF-8. Le frecce indicano i siti di clivaggio. Le regioni implicate nelle interazioni interne sono incorniciate. Rettangoli pieni compaiono sopra i residui che è predetto siano implicati nelle collisioni steriche nei costrutti chimerici. Le stelle indicano punti di rottura importanti nei moduli proteici.

La Figura 11 rappresenta l'espressione e la purificazione di antigeni ricombinanti e complessi di antigeni (SDS-PAGE colorata con Coomassie Blue).

La Figura 12 presenta risultati da analisi di linee cellulari esprimenti stabilmente complessi TGF- $\beta$ 1/GARP. Cellule 300.19 trasfettate stabilmente con controllo vettore vuoto (A), proTGF- $\beta$ 1-GARP (B) o TGF- $\beta$ 1 LAP-GARP (C) sono state marcate fluorescentemente con anticorpi diretti verso le proteine espresse ed esaminate per l'intensità di fluorescenza tramite citometria a flusso. In (D) sono presentati i dati di saggio della Luciferasi che mostrano l'attività di segnalazione di TGF- $\beta$  derivante dalla co-coltura di queste cellule con cellule esprimenti integrina  $\alpha\beta_6$ .

La Figura 13 rappresenta proGDF-8 taggato con istidina ricombinante, separato tramite SDS-PAGE in condizioni riducenti e non riducenti, come visualizzato mediante colorazione Coomassie.

## **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

I fattori di crescita sono molecole di segnalazione cellulare che stimolano una varietà di attività cellulari. Per la loro influenza di vasta portata all'interno dei sistemi biologici, la segnalazione dei fattori di crescita è strettamente regolata, spesso attraverso interazioni con altre biomolecole, la matrice extracellulare e/o cellulare o all'interno di un particolare ambiente o nicchia cellulare. Queste interazioni possono essere dirette o indirette.

I fattori di crescita della famiglia del fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ) sono implicati in una varietà di processi cellulari. Il fattore di crescita legandosi ai recettori tipo II porta alla fosforilazione e all'attivazione del recettore tipo I (Denicourt, C. et al., Another twist in the transforming growth factor  $\beta$ -induced cell-cycle arrest chronicle. PNAS. 2003. 100(26): 15290-1.) I recettori tipo I attivati possono a loro volta fosforilare SMAD associate al recettore (R-SMAD) promuovendo la formazione di dimeri/trimeri di co-SMAD (ad esempio SMAD4) e la traslocazione nucleare. I complessi SMAD collaborano con cofattori per modulare l'espressione di geni bersaglio membri della famiglia del TGF- $\beta$ .

Le cascate di segnalazione di membri della famiglia del TGF- $\beta$  sono implicate in un certo numero di diversi pathway biologici includenti, ma non limitati a inibizione di crescita cellulare, omeostasi dei tessuti, rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), transizione da endoteliale a mesenchimale (EMT) nella migrazione e invasione cellulare e immuno modulazione/soppressione come pure nella transizione da mesenchimale a epiteliale. La segnalazione del TGF- $\beta$  correlata all'inibizione della crescita e all'omeostasi dei tessuti può avere effetto su cellule epiteliali, endoteliali, ematopoietiche ed immunitarie attraverso l'attivazione di p21 e p15<sup>INK</sup> per mediare l'arresto del ciclo cellulare e reprimere myc. In relazione al rimodellamento della ECM, la segnalazione di TGF- $\beta$  può aumentare le popolazioni dei fibroblasti e la deposizione della ECM (ad esempio collagene). La segnalazione di TGF- $\beta$  correlata alla migrazione e invasione cellulare può avere effetto su cellule epiteliali e/o endoteliali, inducendo fenotipi cellula staminale-simili. Tale aspetto di segnalazione può svolgere un ruolo nella proliferazione delle cellule del muscolo liscio dopo intervento chirurgico vascolare e/o collocamento di uno stent. Nel sistema immunitario, il ligando TGF- $\beta$  è necessario per la funzione delle cellule T regolatorie e per il mantenimento della crescita e dell'omeostasi di cellule precursori immunitari. Quasi tutte le cellule

immunitarie comprendono recettori per TGF- $\beta$  e topi knockout per TGF- $\beta$  muoiono dopo la nascita a causa in parte di patologie infiammatorie. Infine, TGF- $\beta$  sopprime l'attivazione indotta da interferone gamma delle cellule natural killer (Wi, J. et al., 2011. *Hepatology*. 53(4):1342-51).

La recente soluzione della struttura cristallina della forma latente di TGF-beta è la prima per l'intera famiglia del TGF-beta e fornisce approfondimenti su questi complessi (Shi, M. et al., Latent TGF- $\beta$  structure and activation. *Nature*. 2011 Jun 15; 474(7351):343-9). Quasi tutta la segnalazione nella famiglia del TGF-beta passa attraverso un pathway comune per cui un ligando dimerico viene riconosciuto da un complesso recettoriale eterotetramerico contenente due recettori di tipo I e due di tipo II. Ciascun recettore ha un dominio serina-treonina chinasi. I recettori di tipo II fosforilano i recettori di tipo I, che a loro volta fosforilano le Smad regolate dal recettore che traslocano e si accumulano nel nucleo e regolano la trascrizione.

Esistono 33 diversi membri della famiglia del TGF-beta negli esseri umani (Figura 1). I membri includono le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), inibina, attivina, fattore di crescita e differenziazione (GDF), miostatina, nodal, ormone anti-Mulleriano, e proteine Lefty. Una rassegna di membri della famiglia del TGF- $\beta$ , molecole di segnalazione correlate come pure loro relazioni si può trovare in Massague., 2000. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1:169-78. In alcune forme di realizzazione, fattori di crescita maturi vengono sintetizzati insieme con i loro prodomini come singole catene polipeptidiche (si veda la Figura 2). In alcune forme di realizzazione, tali catene polipeptidiche possono comprendere siti di clivaggio per la separazione dei prodomini dai fattori di crescita maturi. In alcune forme di realizzazione, tali siti di clivaggio sono siti di clivaggio per la furina riconosciuti e clivati da proproteina convertasi.

In generale, l'omologia tra i domini dei fattori di crescita membri della famiglia del TGF- $\beta$  è relativamente alta. In modo interessante, l'omologia dei prodomini è molto più bassa. Questa mancanza di omologia può essere un fattore importante nella regolazione di fattore di crescita modificata tra membri della famiglia. In alcuni casi, i prodomini possono guidare il corretto ripiegamento e/o la corretta dimerizzazione dei domini dei fattori di crescita. Molto di recente ci si è resi conto che i prodomini, in alcuni casi, hanno funzioni importanti nel dirigere i fattori di crescita (dopo la secrezione) verso posizioni specifiche nella matrice extracellulare (ECM) e/o nella matrice

cellulare, fino a quando non vengono ricevuti altri segnali che causano il rilascio dalla latenza del fattore di crescita. Il rilascio dalla latenza può verificarsi in condizioni ambientali altamente localizzate per cui i fattori di crescita possono agire su brevi distanze (ad esempio da circa 1 diametro di cellula a circa pochi diametri di cellula, da circa 2 diametri di cellula a circa 100 diametri di cellula e/o da circa 10 diametri di cellula a circa 10000 diametri di cellula) e una volta liberati raggiungono la circolazione. Alcuni complessi prodominio-fattore di crescita vengono secreti come omodimeri. In alcune forme di realizzazione, i complessi prodominio-fattore di crescita possono essere secreti come eterodimeri.

Come usato nella presente, il termine "proteina correlata a TGF- $\beta$ " si riferisce a una isoforma di TGF- $\beta$ , un membro della famiglia del TGF- $\beta$  o una proteina correlata a un membro della famiglia del TGF- $\beta$ . Membri della famiglia del TGF- $\beta$  possono includere, ma non sono limitati a qualunque di quelli mostrati nella Figura 1 e/o elencati nella Tabella 1. Questi includono, ma non sono limitati a proteine TGF- $\beta$ , BMP, miostatina, GDF ed inibine. In alcuni casi, la presente descrizione fornisce strumenti e/o metodi per isolare, caratterizzare o modulare proteine correlate a TGF- $\beta$ . Aspetti della presente descrizione forniscono strumenti e/o metodi per caratterizzare e/o modulare attività cellulari correlate alla segnalazione di proteine correlate a TGF- $\beta$ . In altri casi, strumenti della presente descrizione possono comprendere antigeni comprendenti uno o più componenti di una o più proteine correlate a TGF- $\beta$ . Alcuni strumenti possono comprendere anticorpi diretti verso antigeni della presente descrizione. In forme di realizzazione aggiuntive, strumenti della presente descrizione possono comprendere saggi per la rivelazione e/o la caratterizzazione di proteine correlate a TGF- $\beta$ , la rivelazione e/o la caratterizzazione di anticorpi diretti verso proteine correlate a TGF- $\beta$  e/o la rivelazione e/o la caratterizzazione di attività cellulari e/o loro segnalazione cellulare correlata a proteine correlate a TGF- $\beta$ .

#### *Proteine di interesse*

Le proteine correlate al TGF- $\beta$  sono implicate in un certo numero di processi cellulari. Nell'embriogenesi, i 33 membri della famiglia di proteine del TGF- $\beta$  sono implicati nella regolazione dei principali processi di sviluppo e nei dettagli della formazione di molti organi. Gran parte di tale regolazione si verifica prima della nascita; tuttavia, la famiglia continua a regolare molti processi dopo la nascita, includenti, ma non limitati a risposte immunitarie,

guarigione delle ferite, crescita ossea, funzioni endocrine e massa muscolare. Le proteine correlate al TGF- $\beta$  sono elencate e descritte nelle Domande di Brevetto Provvisorie degli Stati Uniti 61/722,919, depositata il 6 Novembre 2012; 61/722,969, depositata il 6 Novembre 2012 e 61/823,552, depositata il 15 Maggio 2013.

Un elenco di pro-proteine della famiglia del TGF- $\beta$  esemplari, cioè la proteina dopo rimozione della sequenza segnale di secrezione, è mostrato nella Tabella 1. La pro-proteina contiene, e ne è il precursore, il prodominio e il fattore di crescita. Nella Tabella sono mostrati i nomi del membro originario della famiglia del TGF- $\beta$  e la sequenza della pro-proteina. Anche identificati in "**grassetto**" e "sottolineati" sono i siti di clivaggio per proproteina convertasi. Al clivaggio, il prodominio risultante conserva questo sito, mentre invece il fattore di crescita maturo inizia dopo il sito di clivaggio. Si noti che Lefty1 e Lefty2 non vengono clivate dalle proproteina convertasi appena prima dell'inizio del fattore di crescita maturo.

**Tabella 1. Pro-proteine della famiglia del TGF-beta**

<b>Membro TGF</b>	<b>Sequenza di prodominio e fattore di crescita</b>	<b>SEQ ID NO</b>
TGF- $\beta$ 1	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRL LRLKLVKEQHVELYQKYSNNSWRYSNRLLAPSDSPEWLSF DVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFT TGRRGLATIHGMRPFLLMATPLERAQHLQSS <b>RHRR</b> ALD TNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPL PIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	1
TGF- $\beta$ 2	SLSTCSTLMDQFMRKRIEAIKQILSKLKLTSPPEDYPEPEEV PPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKI DMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEF RVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPQRYIDSKVVKT RAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHPCCTFPV SNNYIIPNKSELEARFAGIDGTSTYTSQDQKTIKSTRKKNSG KTPHLLMLLPSYRLESQQTNR <b>RKKR</b> ALDAAYCFRNVQDN CCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSD TQHSRVLSTYNTINPEASAPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIE QLSNMIVKSCKCS	2

TGF-β3	<p>SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTH  VPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIH  KFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRNLFR  AEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNL  PTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQP  NGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHN  PHLILMMIPPHRLDNPQGQGG<b>QRKKR</b>ALDTNYCFRNLEENCC  VRPLYIDFRQDLGKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTT  HSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTILYYVGRTPKVE  QLSNMVVKSCKCS</p>	3
GDF-11	<p>AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGG<b>RSSR</b>PAPSVAPEPDGCPV  CVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPKA  PPLQQLDLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQET  DPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAWVYLRPVPRP  ATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIRIRSLKIELHSRSG  HWQSIDFKQVLHSWFRQPQSNWGIENAFDPSGTDLAVTSLG  PGAEGLHPFMELRVLENTK<b>RSRR</b>NLGLDCDEHSSESRCRYP  LTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFQKYPHTH  LVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQIYKIPGM  VVDRCGCS</p>	4
GDF-8 (miostatina)	<p>NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQLSKLRL  ETAPNISKDVRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDD  DYHATTETIITMPTESDFLMQVDGPKCCFFKFSSKIQYNKV  VKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKL  DMNPGTGIWQSIDVKTVLQNLKQPESNLIEIKALDENGH  DLAVTFPGGEDGLNPFLEVKVTDTPK<b>RSRR</b>DFGLDCDEHST  ESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVFLQ  KYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIY  GKIPAMVVDRCGCS</p>	5
Inibina-beta A	<p>SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHI  LNMLHLKRPDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGVGENGYVEI  EDDIGRAEMNELMEQTSEITFAESGTARKTLHFEISKEGSD  LSVVERAEVWLFLKVPKANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGLD  TGEEAEEVGLKGERSELLSEKVV DARKSTWHVFPVSSSIQR  LLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLGKKKKKEEGEGK  KGGGGEGGAGADEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPR<b>RRRR</b>  GLECDGKVNICKKQFFVSKDIGWNDWIIAPSGYHANYCE  GECPSHIAGTSGSSLFHSSTVINHYRMRGHSPFANLKS CCPVT  KLRPMSMLYYDDGQNIKKDIQNMIVEECGCS</p>	6

Inibina-beta B	SPTPPPTPAAPPPPPPGSPGGSQDTCTSCGGFRRPEELGRVDG DFLEAVKRHILSRMQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAG KVREDGRVEIPHLDFGHASPGADGQERVSEIISFAETDGLASSR VRLYFFISNEGNQNLFFVQASLWLYLKLLPYVLEKGSRRKV RVKVVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSWHTFPLTEAIQA LFERGERRLNLDVQCDCSQELAVVPVFDVDPGEESHRRPFVVV QARLGDSRHR <b>IRKR</b> GLECDGRTNLCCRQFFIDFRLIGWND WIIAPTGYGYGNYCEGSCPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRM RGLNPGTVNSCCIPTKLSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVE ECGCA	7
Inibina-beta C	TPRAGGQCPACGGPTLELESQRELLDLAKRSILDKLHLTQR PTLNRPVSRALRTALQHLHGVPQGALLEDNREQECEIISFAE TGLSTINQTRLDHFHSSDRTAGDREVQQASLMFFVQLPSNTT WTLKVRVLVLGPHNTNLTLATQYLLEVDASGWHQLPLGPE AQAACSQGHLTLELVLEGQVAQSSVILGGAHRPFVAARVR VGGKHQ <b>IHRR</b> GIDCQGGSRMCCRQEFFVDFREIGWHDWIIQ PEGYAMNFCIGQCPLHIAAGMPGIAASFHTAVLNLLKANTAAG TTGGGSCCVPTARRPLSLLYDRDSNIVKTDIPDMVVEACGC S	8
Inibina-beta E	QGTGSVPCSCGGSKLAPQAERALVLELAKQQILDGLHLTSRP RITHPPPQAALTRALRRLQPGSVAPNGEEVISFATVTDSTSA YSSLLTFHLSTPRSHHLYHARLWLHVLPTLPGTLCLRIFRWGP RRRRQGSRTLLAEHHITNLGWHTLTLPSGLRGEKSGVLKLQ LDCRPLEGNSTVTGQPRRLDGTAGHQPPFLELKIRANEPGAG <b>RARRR</b> TPTCEPATPLCCRRDHYVDFQELGWRDWILQPEGYQ LNYCSGQCPHLAGSPGIAASFHSAVFSLLKANNPWPASTSC CVPTARRPLSLLYLDHNGNVVKTDPDMVVEACGCS	9
Lefty 1	LTGEQLLGSLLRQLQLKEVPTLDRADMEELVIPHVRAQYV ALLQRSHGDRS <b>RGKR</b> FQSFSFREVAGRFLALEASTHLLVFGM EQRLPPNSELVQAVLRLRFQEPVPAALH <b>RHGRL</b> SPRSARAR VTVEWLRVRDDGSNRTSLIDSRLSVHESGWKAQFDVTEAVN FWQQLSRPRQPLLLQVSVQREHLGPLASGAHKLVRFASQGA PAGLGEPQLELHTLDLGDYGAQGDCDPEAPMTEGTRCCRQE MYIDLQGMKWAENWVLEPPGFLAYECVGTQRPPEALAFK WPFLGPRQCIASETDSLPMIVSIKEGGRTRPQVVSPLNMRVQ KCSCASDGALVPRRLQP	10
Lefty2	LTEEQLLGSLLRQLQLSEVPVLDRADMEKLVIPAHVRAQYV VLLRRSHGDRS <b>RGKR</b> FQSFSFREVAGRFLASEASTHLLVFGM EQRLPPNSELVQAVLRLRFQEPVPAALH <b>RHGRL</b> SPRSAQAR VTVEWLRVRDDGSNRTSLIDSRLSVHESGWKAQFDVTEAVN FWQQLSRPRQPLLLQVSVQREHLGPLASGAHKLVRFASQGA PAGLGEPQLELHTLDLDRDYGAQGDCDPEAPMTEGTRCCRQE MYIDLQGMKWAKNWWLEPPGFLAYECVGTQCPPEALAFN WPFLGPRQCIASETASLPMIVSIKEGGRTRPQVVSPLNMRVQ KCSCASDGALVPRRLQP	11

GDF-15	LSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELKRYEDLLTRLRANQS WEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLP EASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHL RLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARN GDHCPGPGRCRLHTVRSLEDLWADWVLSPREVQVTM CIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP MVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	12
Ormone Anti- Mulleriano	LLGTEALRAEPAVGTSGLIFREDLDWPPGIPQEPLCLVALGG DSNGSSSPLRVVGALSAYEQAF LGAVQRRARWGPRDLATFGV CNTGDRQAALPSLRRLGAWLRDPGGQRLVVLHLEEVTVWEPT PSLRFQEPFPGGAGPPELALLVYPGGPEVTVTRAGLPGAQS LCPSRDTRYLVLAVDRPAGAWRGSGLALTLQPRGEDSRLST ARLQALLFGDDHRCFTRMTPALLLPRSEPAPLPAHGQLDTV PFPPRPSAELEESPPSADPFLETTLRLVRLRVPPARASAPRL ALDPDALAGFPQGLVNLSDPAALERLLDGEEPLLLLRPTAA TTGDPAPLHDPTSAPWATALARRVAAELQAAAAELRSLPGL PPATAPLLARLLALCPGGPGGLGDPLRALLLKKALQGLRVE WRGRDPRGPGRAORSAGATAADGPCALRELSVDLRAERSV LIPETYQANNCQGVCGWPQSDRNPRYGNHVLLKMQVRG AALARPPCCVPTAYAGKLLISLSEERISAHVPMVMVATECGC R	13
Inibina-alfa	CQGLELARELVLAKVRALFLDALGPPAVTREGGDPGVRRLP RRHALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARG LAQEAEEGLFRYMFRRPSQHTRSQRVTSACLWFHTGLDRQGT AASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGHAPPHWAVLHLATS ALSLLTHPVLVLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGG ERARRSTPLMSWPWSPSALRLLQRPPEEPAHANCHRVALN ISFQELGWERWIVYPPSFIFHYCHGGCGLHIPPNLSLPVPGAPP TPAQPYSLPGAQPCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYET VPNLLTQHCACI	14
GDF-1	PVPPGAAALLQALGLRDEPQAPRLRPVPPVMWRLFRRRD PQETRSGSRRTSPGVTLQCHVEELGVAGNIVRHIPDRGAPTR ASEPASAAGHCPEWTVVFDLSAVEPAERPSRARLELRFAAAA AAAPEGGWELSV AQAGQGAGADPGPVLLRQLVPALGPPVR AELLGAAWARNASWPRSLRLALALRPRAPAACARLAEASLL LVTLDPRLCHPLARPRRDAEPVLGGGPGGACRARRLYVSFR EVGWHRWVIAPRGFLANYCQGQCALPVALS GSGGPPALNH AVLRALMHAAAPGAADLPCCVPARLSPISVLFDDNSDNVVL RQYEDMVVDECGCR	15

GDF-3	<p>QEYVFLQFLGLDKAPSPQKFQVPVYILKKIFQDREAAATTGV  SRDLCYVKELGVRGNVLRFLPDQGFFLYPKKISQASSCLQKL  LYFNLSAIKEREQLTLAQLGLDLGPNSYYNLGPELELALFLV  QEPHVWGQTTPKPGKMFVLRVSPWPQGAVHFNLLDVAKD  WNDNPRKNFGLFLEILVKEDRDSGVNFQPEDTCARLRCSLH  ASLLVVTLPDQCHPS<b>RKRR</b>AAIPVKLSCKNLCHRHLFIN  FRDLGWHKWIIAPKGFMANYPCHGECPFSLTISLNSSNYAFMQ  ALMHAVDPEIPQAVCIPTKLSPISMLYQDNNDNVILRHYEDM  VVDEC GCG</p>	16
GDF-5	<p>APDLGQRPGQTRPGLAKAEAKERPPLARNVFRPGGHSYGGG  ATNANARAKGGTGQTGGLTQPKKDEPKLPPRPGGPEPKPG  HPPQTRQATARTVTPKGQLPGGKAPPKAGSVSSFLKKARE  PGPPREPKEFRPPPITPHEYMMSLYRSLSDADRKGGNSSVKL  EAGLANITISFIDKQDDRGVVRKQRYVFDISALEKDGLLG  AELRILRKKPSDTAKPAAPGGGAAQLKLSSCPSGRQPASLL  DVRVSPGLDGSWEVFDIWKLFNRNFKNSAQLCLELEAWERG  RAVDLRGLGFDRAARQVHEKALFLVFGRTKKRDLFFNEIKA  RSGQDDKTVEYELFSQR<b>RKRR</b>APLATRQGKRPSKNLKARCS  RKALHVNFKDMGWDDWIIAPLEYEAFHCEGLCEFPLRSHLE  PTNHAVIQTLMNSMDPESTPPTCCVPTLSPISILFIDSANNVV  YKQYEDMVVE SCGR</p>	17
GDF-6	<p>FQQASISSSSSAELGSTKGMRSRKEGKMQRAPRDS DAGREG  QEPQPRPQDEPRAQQPRAQEPPGRGPRVVPHEYMMSIYRTYSI  AEKLGINASFFQSSKSANTITSFVDRGLDDL SHTPLRRQKYL  DVSMLSDKEELVGAELRLFRQAPSAPWGPPAGPLHVQLFPCL  SPLLLDARTLDPQGAPPAGWEVFDVWQGLRHQPWKQLCLE  LRAAWGELDAGEAEARARGPQQPPPPDLRSLGFGRVRPPQ  ERALLVVFTRSQRKNLFAEMREQLGSAEAAGPGAGAEGSWP  PPSGAPDARPWLPSPGR<b>RRRR</b>AFASR<b>HGKRHGKKSRL</b>RCS  KKPLHVNFKELGWDDWIIAPLEYEAYHCEGVCDFPLRSHLEP  TNHAIQTLMNSMDPGSTPPSCCVPTKLTPI SILYIDAGNNVV  YKQYEDMVVE SCGR</p>	18
GDF-7	<p>RDGLEAAAVLRAAGAGPVRSPGGGGGGGGGRTLAQAAGA  AAVPAAVPRARAARRAAGSGFRNGSVVPHHFMMMSLYRSL  AGRAPAGAAA VSASGHGRADTITGFTDQATQDESAAETGQS  FLFDVSSLNDADEVVGAELRVLRRGSPESGPGSWTSPLLLLS  TCPGAARAPRLLYSRAAEPLVGQRWEAFDVADAMRRHRRE  PRPPRAFCLLRAVAGPVPSPLALRRLGFGWPGGGGSAEER  AVLVVSSRTQRKESLFREIRAQARALGAALASEPLDPGTGT  ASPRAVIGGR<b>RRRR</b>TALAGTRTAQSGGGGAGRGHG<b>RRGRS</b>  RCSRKPLHVDFKELGWDDWIIAPLDYEA YHCEGLCDFPLRSH  LEPTNHAIQTLNMAPDAAPASCCVPARLSPISILYIDAANN  VVYKQYEDMVVEACGCR</p>	19

BMP-10	<p>SPIMNLEQSPLEEDMSLFGDVFSEQDGVDFNTLLQSMKDEFL  KTLNLSDIPTQDSAKVDPPEYMLELYNKFATDRTSMPSANIIR  SFKNEDLFSQPVSFNGLRKYPLLFNVSIPHHEEVIMAE LR LY T  LVQRDRMIYDGVDRKITIFEVLESKGDNEGERNMLVLVSGEI  YGTNSEWETFDVTDAIRRWQKSGSSTHQLEVHIESKHDEAE  DASSGRLEIDTSAQNKHNP LLIVFSDQSSDKERKEELNEMIS  HEQLPELDNLGLDSFSSGPGEEALLQMRSNIIYDSTAR<b>RIRRNA</b>  KGN YCKRTPLYIDFKEIGWDSWIIAPPGYEA YECRGVCNYPL  AEHLTPTKHAIQALVHLKNSQKASKACCVPTKLEPISILYLD  KGVV TYKFKYEGMAVSECGR</p>	20
BMP-9 (GDF-2)	<p>KPLQSWGRGSAGGNAHSPLGVPGGGLPEHTFNLKMFL ENVK  VDFLRSLNLSGVPSQDKTRVEPPQY MIDLYNRYTSDKSTTPA  SNIVRSFMSMEDAISITATEDFPFQKHILLFNISIPRHEQITRAELR  LYVSCQNHVDP SHDLKGSVVIYDVLDGTD AWD SATETKTFL  VSQDIQDEGWETLEVSSAVKR WVRSDSTKSKNKLEVT VESH  RKGCDTLDISVPPGSRNL PFFV VFSNDHSSG TKETRELEMI  SHEQESVLK KLSKDGSTEAGESSHEEDTDGHVAAGSTL<b>ARR</b>  <b>KRS</b>AGAGSHCQKTSLRVNFEDIGWDSWIIAPKEYEAYECKG  GCFFPLADDVPTPKHAI VQTLVHLKFPTKVGKACCVPTKLSPI  SVLYKDDMGVPTLKYHYEGMSVAECGR</p>	21
Nodal	<p>TVATALLRTRGQPSSPSPLAYMLSLYRDPLPRADIIRSLQAED  VAVDGQNWTF AFD FSFLSQEDLAWAELRLQLSSPVDL PTE  GSLAIEIFHQPKPDTEQASD SCLERFQMDLFTV TLSQVTFSLG  SMVLEVTRPLSKWLKRPGALEKQMSRVAGECWPRPPTPPAT  NVLLMLYSNLSQEQRQLGGSTLLWEAESSWRAQEGQLSWE  WGK<b>RHRR</b>HHL PDRSQLCRKVKFQVDFNLIGWGSWIIYPKQ  YNA YRCEGECNPVGE EFHPTNHAYIQSLLKRYQPHRVPSTC  CAPVTKPLSMLYVDNGRVLLDHHKDMIVEECGCL</p>	22
BMP-2	<p>LVPELGRRKFAAASSGRPSSQPSDEVLSEFELRLLSMFGLKQR  PTPSRDAVVPPYMLDLYRRHSGQPGSPAPDHLERAASRAN  TVRSFHHEESLEELPETS GKTTRRFFNLSSIPTEEFITS AELQV  FREMQDALGNSSFHHRINIYEIIPATANSKFPVTRLLDTR  LVNQNASRWESFDVTPAVMRWTAQGHANHG FVVEVAHLE  EKQGVSKRHV<b>RISRS</b>LHQDEHSWSQIRPLLVTFGHDGKGHPL  HK<b>REKR</b>QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGVNDWIV  APPGYHAFYCHGECPFPLADHLNSTNHAI VQTLVNSVNSKIP  KACCVPTELSAISMLYLDENEKVVLKNYQDMVVEGCGCR</p>	23

BMP-4	<p>GASHASLIPETGKKKVAEIQGHAGGRRSGQSHELLRDFEATL  LQMFGRLRRRPQPSKSAVIPDYMRDLYRLQSGEEEEEQIHSTG  LEYPERPASRANTVRSFHHEEHLNIPGTSENSAFRFLNLSI  PENEVISSAELRLFREQVDQGPDWERGFHRINIYEVMPKPAE  VVPGLHITRLLDTRLVHHNVTRWETFVDVSPAFLRWTRKQP  NYGLAIEVTHLHQTRTHQQGHV<b>RSR</b>SLPQSGNWAQLRPL  LVTFGHDGRGHALTRRR<b>RAKR</b>SPKHHSQRARKKNKNCRRH  SLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPLADHLNST  NHAIVQTLVNSVNSSIPKACCVPTLSAISMLYLDEYDKVVL  KNYQEMVVEGCGCR</p>	24
BMP-5	<p>DNHVHSSFIYRRLRNHERREIQREILSILGLPHRPRPFSPGKQA  SSAPLFMLDLYNAMTNEENPEESEYSVRASLAEETRGAARKG  YPASPNGYPRRIQLSRTTPLTTQSPPLASLHDTNFLNDADMV  MSFVNIVERDKDFSHQRRHYKEFRDLTQIPHGEAVTAAEFR  IYKDRSNNRFENETIKISYQIIKEYTNRDADLFLDTRKAQAL  DVGWLVFDITVTSNHVVINPQNNLGLQLCAETGDGRSINVK  SAGLVGRQGPQSKQPFMVAFKASEVLL<b>RSVR</b>AANKRKNQ  NRNKSSSHQDSSRMSSVGDYNTSEKQACKKHEL YVSFRDL  GWQDWIAPEGYAAFYCDGECFPLNAHMNATNHAIVQTLV  HLMFPDHVPKCCAPTCLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMV  VRSCGCH</p>	25
BMP-6	<p>CCGPPPLRPPLAAAAAAGGQLLDGGSPGRTEQPPSPQS  SSGFLYRRLKTQEKREMQKEILSVLGLPHRPRPLHGLQQQP  PALRQQEEQQQQQLPRGEPGRLKSAPLFMLDLYNALSA  DNDEDGASEGERQSWPHEAASSQRQPPGAAHPLNRKS  LLAPGSGSGGASPLTSAQDSAFNLNDADMVMSFVNLYEYDKE  FSPLQRHHKEFKFNLSQIPEGEVVTAAEFRIYKDCVMGSFKN  QTFLISYQVLQEHQHRSDLFLDTRVVWASEEGWLEFDIT  ATSNLWVTPQHNMGQLQSVVTRDGVHVHPRAAGLVGRD  GPYDKQPFMVAFKVSSEVHV<b>RTTRSASSRRR</b>QSRNRSTQS  QDVARVSSADYNSSELKTACRKHELYVSFQDLGWQDWIA  PKGAAANYCDGECFPLNAHMNATNHAIVQTLVHLMNPEY  VPKCCAPTCLNAISVLYFDDNSNVILKKYRNMVVRACGCH</p>	26
BMP-7	<p>DFSLDNEVHSSFIHRRRLRSQERREMQRREILSILGLPHRPRPHLQ  GKHNSAPMFMLDLYNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFST  QGPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLYEYDKEFFHPRYHHR  EFRFDLSKIPEGEAVTAAEFRIYKDYIRERFDNETFRISVYQVL  QEHLGRESDFLLDSRTLWASEEGWLVFDITATSNHWVNP  RHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAGLIGRHGPQNKQPFMVAFK  KATEVHF<b>RSIR</b>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENS  SSDQRQACKKHEL YVSFRDLGWQDWIAPEGYAAAYCEGEC  AFPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKCCAPTCLNAISV  LYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH</p>	27

BMP-8A	GGGGLRPPPGCPQRRLLG <b>REERRD</b> VQREILAVLGLPGRPRPR APPAASRLPASAPLFMLDLYHAMAGDDDEDGAPAEQRLGR ADLVMSFVNMVERDRALGHQEPHWKEFRFDLTQIPAGEAVT AAEFRIYKVPSIHLNRTLHVSMFQVVQE QSNRESDLFFLDL QTLRAGDEGWLVLDVTAASDCWLLKRHKDLGLRLYVETED GHSVDPGLAGLLGQRAPRSQQPFVVTFFRASPSPI <b>RTPR</b> AVR PLRRRQPKKSNELPQANRLPGIFDDVVRGSHGRQVCRRHEL YV SFQDLGWLDWVIAPQGYSAYYCEGECSPFLDSCMNATNHAI LQSLVHLMKPNVPAKACCAPTCLSATS SVLYYDSSNNVILRK HRNMVVKACGCH	28
BMP-8B	GGGGLRPPPGCPQRRLLG <b>REERRD</b> VQREILAVLGLPGRPRPR APPAASRLPASAPLFMLDLYHAMAGDDDEDGAPAERRLGRA DLVMSFVNMVERDRALGHQEPHWKEFRFDLTQIPAGEAVTA AEFRIYKVPSIHLNRTLHVSMFQVVQE QSNRESDLFFLDLQT LRAGDEGWLVLDVTAASDCWLLKRHKDLGLRLYVETEDGH SVDPLAGLLGQRAPRSQQPFVVTFFRASPSPI <b>RTPR</b> AVRPLR RRQPKKSNELPQANRLPGIFDDVHGSHGRQVCRRHEL YVSF QDLGWLDWVIAPQGYSAYYCEGECSPFLDSCMNATNHAILQ SLVHLMMPDAVPKACCAPTCLSATS SVLYYDSSNNVILRKHR NMVVKACGCH	29
BMP-15	MEHRAQMAEGGQSSIALLAEAPTLPLIEELLEESPGEQPRKPR LLGHSLRYMLELYRRSADSHGHPRENRTIGATMVRLVKPLTS VARPHRGTWIHIQLGFPLRPNRGLYQLVRATVVYRHHQLT RFNLSCHVEPWVQKNPTNHFPSSEGSSKPSLMSNAWKEMD ITQLVQQRFWNNKGHRILRLRFMCQQQKDSGGLELWHGTSS LDIAFLLLYFNDTHKSIRKAKFLPRGMEEFMERESLL <b>RRTRQ</b> ADGISA EVTASSSKHSGPENNQCSLHPFQISFRQLGWDHWIIA PPFYTPNYCKGTCLRVL RDGLNSPNHAIQNLINQLVDQSVPR PSCVPYKYVPISVLMIEANGSILYKEYEGMIAESCTCR	30
GDF-9	SQASGGEAQIAASAELESGAMPWSLLQHIDERDRAGLLPALF KVLSVGRGGSPRLQPDSRALHYMKKLYKTYATKEGIPKSNR SHLYNTVRLFTPCTRHKQAPGDQVTGILPSVELL FNLD RITTV EHLKSVLLYNINNSVSFSSAVKVCNLMIKEPKSSSRTLGRA PYSFTFNSQFEFGKHKWIQIDVTSLLQPLVASNKRSIHMSIN FTCMKDQLEHPSAQNGLFNMTLVSPSLILYLNDTSAQAYHS WYSLHYKRRPSQGPQERSLSAYPVGEEAAEDGRSSH <b>RHR</b> <b>R</b> QGETVSSELKKPLGPASFNLSEYFRQFLLPQNECELHDFRLS FSQLKWDNWIVAPHRYNPRYCKGDCPRAVGHRYGSPVHTM VQNIIEKLDSSVPRPSCVPAKYSPLSVLTIEPDGSIAYKEYED MIATKCTCR	31

BMP-3	<p>ERPKPPFPELRKAVPGDRTAGGGPDSSELQPQDKVSEHMLRLY          DRYSTVQAARTPGSLEGGSQPWRPRLREGNTVRSFRAAAA          ETLERKGLYIFNLSTLTKSENILSATLYFCIGELGNISLSCPVSG          GCSHHAQRKHIQIDLSAWTLKFSRNQSQLLGHLSDMAKSH          RDIMSWLSKDDITQLLRKAKENEEFLIGFNITSKGRQLPKRRLP          FPEPYILVYANDAAISEPESVSSSLQGHRNFPTGTVPKWDSHI          RAALSIERRKKRSTGVLLPLQNNELPGAQYQYKKDEVWEER          KPYKTLQAQAPEKSKNKK<b>KKOR</b>KGPHRKSQTLQFDEQTLK<b>K</b>  <b>ARR</b>KQWIEPRNCARRYLKVDFADIGWSEWISPKSFDAYYCS          GACQFPMPKSLKPSNHATIQSIVRAVGVVPGIPEPCCVPEKMS          SLSILFFDENKNVVLKVYPNMTVESACR</p>	32
GDF-10	<p>SHRAPAWSALPAAADGLQGDRDLQRHPGDAAATLGPSAQD          MVAVHMHRLYEKYSRQGARPGGGNTVRSFRARLEVVDQK          AVYFFNLSTMQDSEMILTATFHFYSEPPRWPRALEVLCKPRA          KNASGRPLPLGPPTRQHLLFRSLSQNTATQGLLRGAMALAPP          PRGLWQAKDISPIVKAARRDGELLSAQLDSEERDPGVPRPS          PYAPYILVYANDLAISEPNSVAVTLQRYDPPFAGDPEPRAAP          NNSADPRVRAAQAATGPLQDNELPGLDERPPRAHAQHFKH          QLWPSPFRAKPRPGRKDRKKGQEVFMAASQVLDDEKT          M<b>QKARR</b>KQWDEPRVCSRRYLKVDADIGWNEWISPKSFDA          YYCAGACEFPMPKIVRPSNHATIQSIVRAVGIIPGIPEPCCVPD          KMNSLGVLFLENRRNVVLKVYPNMSVDTACR</p>	33
GDNF	<p>FPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMPEDYDPQF          DDVMDFIQATIK<b>RLKR</b>SPDKQMAVLP RRERNRQAAAANPE          NSRKGGRRGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFR          YCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSDKVGQACCRPIAFD          DDLSFLDDNLVYHILRKHSARKCGCI</p>	34
NRTN	<p>IWMCREGLLLSHRLGPALVPLHRLPRTLDARIARLAQYRALL          QGAPDAMELRELTPWAGRPPGPRRRAGP<b>RRRR</b>ARARLGAR          PCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACEAAARVYD          LGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFDAHSRY          HTVHEL SARECACV</p>	35
PSPN	<p>WGPDARGVPVADGEFSSEQVAKAGGTWLGTHRPLA<b>RLRR</b>A          LSGPCQLWSLTLVAELGLGYASEEKVIFRYCAGSCPRGART          QHGLALARLQGGRAHGGPCRPTRYTDVAFLDDRHRWQR          LPQLSAAACGCGG</p>	36
ARTN	<p>SLGSAPRSPAPREGPPPVLASPAGHLPGGRTARWCSG<b>RARRP</b>          PPQPSRAPPPPAPPSALP<b>RGGAAR</b>AGGPGSRARAAGARGC          RLRSQLVVPRALGLGHRSDLVFRFCGSCRRARSPHDLSL          ASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT          VDRLSATAACGLG</p>	37

Si noti che alcuni prodomini possono essere clivati tramite enzimi proproteina convertasi. Come utilizzato nella presente, il termine "proproteina convertasi" si riferisce a un enzima che cliva un prodominio da una proteina tradotta per facilitare la maturazione della proteina. Alcune proproteina convertasi della presente descrizione includono gli enzimi membri della famiglia delle proproteina convertasi subtilisina-simili (SPC). La famiglia delle SPC comprende serina endoproteasi calcio-dipendenti che includono, ma non sono limitate a furina/PACE, PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PACE4 e PC7 (Fuller et al., 2009. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50(12):5759-68.) GDF-11 può, in alcuni casi, essere clivato da PC5/6. In alcuni casi, le proproteina convertasi possono clivare le proproteine in siti aggiuntivi, diversi da quelli indicati nella Tabella 1. In alcuni casi, le pro-proteine possono essere clivate in un primo sito di clivaggio (il primo sito essendo il sito più vicino all'N-terminale). In altri casi, le proproteine possono essere clivate in un sito di clivaggio diverso da un primo sito di clivaggio. In alcuni casi, il clivaggio ad opera di proproteina convertasi può verificarsi a livello intracellulare. In alcuni casi, il clivaggio ad opera di proproteina convertasi può verificarsi a livello extracellulare.

Molte proteine membri della famiglia del TGF- $\beta$  vengono sintetizzate in unione con prodomini. Alcuni prodomini possono rimanere associati con i fattori di crescita dopo il clivaggio. Tali associazioni possono formare complessi fattore di crescita-prodominio (GPC) latenti che modulano la disponibilità dei fattori di crescita per la segnalazione cellulare. I fattori di crescita possono essere rilasciati dalla latenza nei GPC attraverso associazioni con una o più proteine extracellulari. In alcuni casi, il rilascio del fattore di crescita può dipendere dalla forza applicata ai GPC attraverso interazioni con proteine extracellulari. Tali forze possono tirare dalle regioni C-terminali e/o N-terminali dei GPC comportando il rilascio dei fattori di crescita associati.

In alcuni membri della famiglia del TGF- $\beta$ , la porzione prodominio del GPC è responsabile della ritenzione dei fattori di crescita e del blocco dell'interazione dei fattori di crescita trattenuti con i loro recettori. Le porzioni prodominio dei GPC che funzionano a tal proposito sono riferite come peptidi associati a latenza (LAP). È noto che TGF- $\beta$ 1, 2 e 3 comprendono i LAP. Alcuni prodomini possono comprendere domini LAP-simili. Come usato nella presente, il termine "dominio LAP-simile" si riferisce a porzioni prodominio dei GPC e/o a prodomini liberi che possono essere a livello di struttura simili o sintetizzati in modo analogo ai LAP, ma che possono non

funzionare per impedire le interazioni fattore di crescita/recettore. I prodomini di GDF-8 e GDF-11 comprendono domini LAP-simili.

A seconda di una varietà di fattori, i fattori di crescita possono essere liberi o associati con uno o più LAP o domini LAP-simili. La Figura 3 è una rappresentazione schematica che rappresenta una forma di realizzazione in cui un dimero di fattore di crescita può associarsi con un dimero di LAP. In alcune forme di realizzazione, i GPC comprendono moduli proteici necessari per differenti aspetti di segnalazione, secrezione, latenza e/o rilascio del fattore di crescita da GPC latenti. Come usato nella presente, il termine "modulo proteico" si riferisce a qualunque componente, regione e/o caratteristica di una proteina. I moduli proteici possono variare in lunghezza, comprendendo uno o più amminoacidi. I moduli proteici possono essere lunghi da circa 2 residui amminoacidici a circa 50 residui amminoacidici, da circa 5 residui amminoacidici a circa 75 residui amminoacidici, da circa 10 residui amminoacidici a circa 100 residui amminoacidici, da circa 25 residui amminoacidici a circa 150 residui amminoacidici, da circa 125 residui amminoacidici a circa 250 residui amminoacidici, da circa 175 residui amminoacidici a circa 400 residui amminoacidici, da circa 200 residui amminoacidici a circa 500 residui amminoacidici e/o almeno 500 residui amminoacidici.

In alcuni casi, i moduli proteici comprendono una o più regioni con caratteristiche funzionali note (ad esempio dominio di legame a proteina, dominio di legame a acido nucleico, tasca idrofobica, etc.) I moduli proteici possono comprendere domini proteici funzionali necessari per differenti aspetti di segnalazione, secrezione, latenza e/o rilascio del fattore di crescita da conformazioni latenti.

In alcuni casi, i moduli proteici possono essere derivati da proteine correlate a TGF- $\beta$ . Tali moduli proteici possono includere, ma non sono limitati a peptidi associati a latenza (LAP), domini LAP-simili, domini di fattore di crescita, "regioni gancio", siti di clivaggio per proproteina convertasi (ad esempio siti di clivaggio per furina), siti di clivaggio per B/TP, "regioni braccio", "regioni dita", residui (quali residui di cisteina ad esempio) per associazioni con proteine extracellulari [ad es. proteina legante il TGF- $\beta$  latente (LTBP), fibrillina e/o proteina con ripetizioni predominanti della glicoproteina A (GARP)], loop di latenza (anche riferiti nella presente come "lazi di latenza"), regioni elicoidali alfa 1, regioni elicoidali alfa 2, sequenze RGD e regioni cravatta a farfalla. La Figura 4 è un

diagramma schematico di una forma di realizzazione che rappresenta dimeri di LAP e di fattore di crescita comprendenti moduli proteici.

In alcuni casi, i moduli proteici possono essere derivati da una o più isoforme di TGF- $\beta$  (ad es. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e/o TGF- $\beta$ 3). Tali moduli proteici possono comprendere i moduli proteici e/o le sequenze amminoacidiche elencate nella Tabella 2. Alcuni moduli proteici della presente invenzione possono comprendere sequenze amminoacidiche simili a quelle nella Tabella 2, ma possono comprendere amminoacidi aggiuntivi o in numero inferiore rispetto a quelli elencati. Tali sequenze amminoacidiche possono comprendere circa 1 amminoacido in più o in meno, circa 2 amminoacidi in più o in meno, circa 3 amminoacidi in più o in meno, circa 4 amminoacidi in più o in meno, circa 5 amminoacidi in più o in meno, circa 6 amminoacidi in più o in meno, circa 7 amminoacidi in più o in meno, circa 8 amminoacidi in più o in meno, circa 9 amminoacidi in più o in meno, circa 10 amminoacidi in più o in meno o più di 10 amminoacidi in più o in meno sulle estremità N-terminali e/o C-terminali.

**Tabella 2. Moduli proteici di TGF- $\beta$**

<b>Membro Famiglia del TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Modulo proteico</b>	<b>Sequenza di prodominio e fattore di crescita</b>	<b>SEQ ID NO</b>
TGF- $\beta$ 1	peptide associato a latenza	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPP SQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEP EPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQS THSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRL KLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSD SPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHC SCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNR PFLLLMATPLERAQHLQSSRHR	38
TGF- $\beta$ 2	peptide associato a latenza	SLSTCSTLMDQFMKRIEAIRGQILSKLKLTS PEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRAA ACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFPSENAIPP TFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVF RLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYI DSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKD RNLGFKISLHCPCTFVPSNYYIIPNKSELEAR FAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLL LMLLPSYRLESQQTNRKRR	39

TGF-β3	peptide associato a latenza	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLT SPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGE REEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHN ELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEF	40
		RVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQR YIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRE SNLGLLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKF KGVNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILM MIPPHRLDNPQGQGRKKR	
TGF-β1	regione camicia di forza	LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLRLASPP SQGEVPPGPLP	41
TGF-β2	regione camicia di forza	SLSTCSTLDMQDFMRKRIEAIRGQILSKLKLTS PEDYPEPEEVP	42
TGF-β3	regione camicia di forza	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLT SPPEPTVMTHVP	43
TGF-β1	dominio di fattore di crescita	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL LYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRK PKVEQLSNMIVRSCKCS	44
TGF-β2	dominio di fattore di crescita	ALDAAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYANFCAGACPYLWSSDTQHSRVL SLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTP KIEQLSNMIVKSKCS	45
TGF-β3	dominio di fattore di crescita	ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWK WVHEPKGYANFCGSPCYLRSADTTHTSTVLG LYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTP KVEQLSNMVVKSKCS	46
TGF-β1	regione gancio	residui 74-76, YYA	--
TGF-β2	regione gancio	residui 79-81, YYA	--
TGF-β3	regione gancio	residui 80-82, YYA	--

TGF-β1	regione sito di clivaggio per furina	RHRR	47
TGF-β2	regione sito di clivaggio per furina	RKKR	48
TGF-β3	regione sito di clivaggio per furina	RKKR	48
TGF-β1	regione braccio	EAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAK EVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSE LREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVLY QKYSNNSWRYSNRLAPSDSPEWLSFDVTGV VRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVD INGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLER AHLQSSRHRR	49
TGF-β2	regione braccio	PEVISIYNSTRDLLQEKASRRRAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVR FDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLLQNPKEARVP EQRIELYQILKSKDLTSPTRQYIDSKVVKTRAE GEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLHC PCCTFVPSNYYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYT SGDQKTIKSTRKKNKGKTPHLLMLLPSYRLES QQTNRKRR	50
TGF-β3	regione braccio	YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTES EYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSK VFRFNVSSVEKNRNLFRAEFRVLRVNPSSKR NEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRTG AEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCP HTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVNEDDHGR GDLGRLKKQKDHHPHLILMMIPPHRLDNPQG GGQRKKR	51
TGF-β1	regione dita 1	CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC	52
TGF-β2	regione dita 1	CLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCA	53
TGF-β3	regione dita 1	CVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANFCS	54
TGF-β1	regione dita 2	CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSC KCS	55
TGF-β2	regione dita 2	CVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKC S	56

TGF-β3	regione dita 2	CVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSC KCS	57
TGF-β1	residuo per associazione con LTBP	Cys 4	--
TGF-β2	residuo per associazione con LTBP	Cys 5	--
TGF-β3	residuo per associazione con LTBP	Cys 7	--
TGF-β1	residuo per associazione con GARP	Cys 4	--
TGF-β2	residuo per associazione con GARP	Cys 5	--
TGF-β3	residuo per associazione con GARP	Cys 7	--
TGF-β1	loop di latenza	LASPPSQGEVPPGPL	58
TGF-β2	loop di latenza	LTSPPEDYPEPEE	59
TGF-β3	loop di latenza	LTSPPEPTVMTHV	60
TGF-β1	regione elicoidale alfa 1	LSTCKTIDMELVKRKRKRIEAIKQILSKLR	61
TGF-β2	regione elicoidale alfa 1	LSTCSTLDMDQFMRKRIEAIKQILSKLK	62
TGF-β3	regione elicoidale alfa 1	LSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIKQILSKLR	63
TGF-β1	regione loop di innesco	NGFTTGRRGDLATIHGMNRP	64
TGF-β2	regione loop di innesco (lunga)	FAGIDGTSTYTSQDKTIKSTRKKNSGKTP	65
TGF-β3	regione loop di innesco	GVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHP	66
TGF-β1	regione sequenza RGD	residuo 215-217, RGD	--
TGF-β3	regione sequenza RGD	residuo 241-243, RGD	--

TGF- $\beta$ 1	regione cravatta a farfalla	CSCDSRDNTLOVD	67
TGF- $\beta$ 2	regione cravatta a farfalla	CPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEAR	68
TGF- $\beta$ 3	regione cravatta a farfalla	CPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK	69

In alcuni casi, i LAP o i domini LAP-simili comprendono la porzione prodominio di una proteina correlata a TGF- $\beta$  e/o un GPC. Alcuni LAP o domini LAP-simili possono associarsi con fattori di crescita in GPC. Alcuni LAP possono impedire stericamente l'associazione dei fattori di crescita con uno o più recettori cellulari. I LAP o i domini LAP-simili possono comprendere "regioni braccio" e/o "regioni camicia di forza". Alcuni LAP o domini LAP-simili possono comprendere regioni C-terminali riferite nella presente come "regioni cravatta a farfalla". In alcuni dimeri di LAP o dominio LAP-simile, le regioni cravatta a farfalla di ciascun monomero possono associarsi e/o interagire. Tali associazioni possono comprendere la formazione di legami disolfuro, come si trova tra i monomeri di LAP delle isoforme di TGF- $\beta$ .

In alcuni casi, le regioni braccio possono comprendere regioni loop di innesco. I loop di innesco possono comprendere regioni che si associano con le integrine. Tali regioni possono comprendere sequenze amminoacidiche comprendenti RGD (Arg-Gly-Asp). Regioni comprendenti sequenze RGD sono riferite nella presente come regioni di sequenza RGD. In alcuni casi, i LAP o i domini LAP-simili comprendono loop di latenza (anche riferiti nella presente come "lazi di latenza"). Alcuni loop di latenza possono mantenere le associazioni tra i LAP o i domini LAP-simili e i fattori di crescita presenti nei GPC. I LAP o i domini LAP-simili possono anche comprendere regioni gancio. Tali regioni gancio possono mantenere le associazioni tra i LAP o i domini LAP-simili e i fattori di crescita presenti nei GPC. Alcune regioni gancio possono mantenere conformazioni di LAP o di dominio LAP-simile che promuovono la ritenzione del fattore di crescita.

In alcuni casi, i GPC possono richiedere clivaggio enzimatico per la dissociazione dei fattori di crescita legati. Tale clivaggio può essere effettuato in alcuni casi da membri della famiglia della proteinasi BMP-1/Tolloide-simile (B/TP) (Muir et al., 2011. J Biol Chem. 286(49):41905-11.) Queste metalloproteinasi possono includere, ma non sono limitate a BMP-1, proteina tolloide di mammifero (mTLD,) tolloide-simile 1 di mammifero (mTLL1) e

tolloide-simile 2 di mammifero (mTLL2.) GPC esemplari che possono essere clivati tramite tali metalloproteinasi possono includere, ma non vi sono limitati, GDF-8 e GDF-11. In alcuni casi, GDF-8 può essere clivato tramite mTLL2. In alcuni casi, il clivaggio tramite tolloide può verificarsi a livello intracellulare. In alcuni casi, clivaggio tramite tolloide può verificarsi a livello extracellulare.

Le regioni camicia di forza possono comprendere regioni elicoidali alfa 1. In alcuni casi, le regioni elicoidali alfa 1 possono essere posizionate tra i monomeri di fattore di crescita. Alcune regioni elicoidali alfa 1 comprendono regioni N-terminali di LAP o domini LAP-simili. Regioni elicoidali alfa 1 possono anche comprendere regioni N-terminali per le associazioni extracellulari. Tali associazioni extracellulari possono comprendere proteine della matrice extracellulare e/o proteine associate con la matrice extracellulare. Alcune associazioni extracellulari possono comprendere associazioni con proteine che possono includere, ma non sono limitate a LTBP (ad es. LTBP1, LTBP2, LTBP3 e/o LTBP4), fibrilline (ad es. fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3 e/o fibrillina-4), perlecano, decorina e/o GARP (ad es. GARP e/o LRRC33). Le associazioni extracellulari N-terminali possono comprendere legami disolfuro tra residui di cisteina. In alcuni casi, proteine della matrice extracellulare e/o proteine associate con la matrice extracellulare possono comprendere legami con una o più regioni dei LAP/domini LAP-simili diverse dalle regioni N-terminali.

In alcuni casi, i domini di fattore di crescita comprendono uno o più monomeri di fattore di crescita. Alcuni domini di fattore di crescita comprendono dimeri di fattore di crescita. Tali domini di fattore di crescita possono comprendere omodimeri o eterodimeri di fattore di crescita (comprendenti monomeri di fattore di crescita da proteine correlate a TGF- $\beta$  diverse). Alcuni domini di fattore di crescita possono comprendere regioni dita. Tali regioni dita possono comprendere foglietti pieghettati  $\beta$ . Le regioni dita possono associarsi con i LAP o i domini LAP-simili. Alcune regioni dita possono mantenere l'associazione tra domini di fattore di crescita e i LAP o i domini LAP-simili.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere moduli proteici da proteine fattori di crescita e di differenziazione (GDF). Tali moduli proteici da GDF possono comprendere i moduli proteici e/o le sequenze amminoacidiche elencate nella Tabella 3. In alcuni casi, i moduli proteici della presente descrizione

possono comprendere sequenze amminoacidiche simili a quelle nella Tabella 3, ma possono comprendere amminoacidi in più o in meno rispetto a quelli elencati. Alcune tali sequenze amminoacidiche possono comprendere circa 1 amminoacido in più o in meno, circa 2 amminoacidi in più o in meno, circa 3 amminoacidi in più o in meno, circa 4 amminoacidi in più o in meno, circa 5 amminoacidi in più o in meno, circa 6 amminoacidi in più o in meno, circa 7 amminoacidi in più o in meno, circa 8 amminoacidi in più o in meno, circa 9 amminoacidi in più o in meno, circa 10 amminoacidi in più o in meno o più di 10 amminoacidi in più o in meno sulle estremità N-terminali e/o C-terminali.

**Tabella 3. Moduli proteici da GDF**

<b>Membro Famiglia del TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Modulo proteico</b>	<b>Sequenza di Prodominio e Fattore di Crescita</b>	<b>SEQ ID NO</b>
GDF-8	prodominio	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEA IKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLREL IDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPT ESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVKAQ LWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTG IRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNLKQPE SNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFL EVKVTDTPKRSRR	70
GDF-11	prodominio	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPPAPSV APEPDGCPVCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLR LKEAPNISREVVKQLLPKAPPLQQLDLHDFQG DALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDPAV QTDGSPCCCHFHFSKVMFTKVLKQWVYL RPVPRPATVYQLILRLKPLTGEAGGGGGGR RHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFR QPQSNWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGH PFMELRVLENTKRSRR	71
GDF-8	regione camicia di forza	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEA IKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPL	72
GDF-11	regione camicia di forza	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPPAPSV APEPDGCPVCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLR LKEAPNISREVVKQLLPKAPPL	73

GDF-8	dominio di fattore di crescita	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWI IAPKRYKANYCSGECEVFLQKYPHTLVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGK IPAMVVDRCGCS	74
GDF-11	dominio di fattore di crescita	NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWI IAPKRYKANYCSGQCEYMFQMOKYPHTLVQQ ANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQIIYG KIPGMVVDRCGCS	75
GDF-8	regione gancio	residui 87-89, DYH	--
GDF-11	regione gancio	residui 110-112, EYH	--
GDF-8	regione sito di clivaggio per furina	RSRR	76
GDF-11	regione sito di clivaggio per furina	RSRR	76
GDF-8	sito di clivaggio per BMP/Tolloide	tra residui R75 e D76	--
GDF-11	sito di clivaggio per BMP/Tolloide	tra residui G97 e D98	--
GDF-8	regione braccio	RELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIIT MPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKV KAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTR YTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNLK QPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLN PFLEVKVTDTPKRSRR	77
GDF-11	regione braccio	QQILDLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVI SMAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKV LKAQLWVYLRVPRPATVYLQILRLKPLTGEG TAGGGGGRRHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDF KQVLHSWFRQPSNWGIEINAFDPSGTDLAVT SLGPGAEGLHPFMELRVLENTKRSRR	78
GDF-8	regione dita 1	CRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCS	79
GDF-11	regione dita 1	CRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCS	79
GDF-8	regione dita 2	CTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDR GCS	80

GDF-11	regione dita 2	CTPTKMSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMVVDR CGCS	81
GDF-8	loop di latenza	RLETAPNISKDVIRQLLPKAPPL	82
GDF-11	loop di latenza	RLKEAPNISREVVKQLLPKAPP	83
GDF-8	regione elicoidale alfa 1	GLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSK	84
GDF-11	regione elicoidale alfa 1	DGCPVCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKL	85
GDF-8	regione cravatta a farfalla	DENGHDLAVTFPGP	86
GDF-11	regione cravatta a farfalla	DPSGTDLAVTSLG	87

I domini di fattore di crescita tra i membri della famiglia del TGF- $\beta$  sono maggiormente conservati mentre i prodomini comprendono una percentuale di identità molto più bassa tra i membri della famiglia (Figura 9). La Tabella 5 dimostra questa tendenza tra le isoforme del TGF- $\beta$ .

**Tabella 5. Percentuale di identità tra le isoforme del TGF- $\beta$ : LAP vs fattore di crescita**

	<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>TGF-<math>\beta</math>2</b>	<b>TGF-<math>\beta</math>3</b>
TGF- $\beta$ 1	-	31.2% vs 71.2%	31.9% vs 76.7%
TGF- $\beta$ 2	31.2% vs 71.2%	-	44.4% vs 79.4%
TGF- $\beta$ 3	31.9% vs 76.7%	44.4% vs 79.4%	-

I prodomini possono variare in lunghezza da circa 50 a circa 200, da circa 100 a circa 400 o da circa 300 a circa 500 residui amminoacidici. In alcuni casi, i prodomini variano da circa 169 a circa 433 residui. I prodomini possono essere non correlati in sequenza e/o avere un basso livello di omologia. Alcuni prodomini possono avere ripiegamenti e/o strutture tridimensionali simili. I prodomini di membri della famiglia del TGF- $\beta$  possono comprendere loop di latenza. Tali loop possono essere ricchi in prolina. La lunghezza dei loop di latenza può determinare la capacità di tali loop di circondare le regioni dita del fattore di crescita.

In alcuni casi, i moduli proteici da alcuni membri della famiglia del TGF- $\beta$  comprendono bassa identità di sequenza con moduli proteici da altri membri della famiglia del TGF- $\beta$ . Tale bassa identità di sequenza può indicare ruoli specializzati per tali membri della famiglia con moduli proteici distinti.

L'associazione dei GPC con proteine extracellulari può rafforzare le interazioni prodominio-fattore di crescita. In alcuni casi, tali proteine extracellulari possono includere, ma non sono limitate a LTBP, fibrilline e/o GARP. In alcuni casi, le associazioni con proteine extracellulari sono richieste per mantenere latenti i fattori di crescita nei GPC.

È stato mostrato che l'espressione di GARP è richiesta per l'espressione in superficie dei GPC sulla superficie di cellule di origine ematopoietica (Tran, D.Q. et al., GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- $\beta$  on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. PNAS. 2009, Jun 2. 106(32): 13445-50). GARP può agire come una catena per mantenere in posizione i GPC sulla superficie di queste cellule, includenti, ma non limitate alle cellule T regolatorie e/o alle piastrine.

#### *Proteine ricombinanti*

In alcuni casi, la presente descrizione fornisce proteine ricombinanti. Come usato nella presente, il termine "proteina ricombinante" si riferisce a una proteina prodotta tramite un gene e/o un processo artificiale (ad es. ingegneria genetica). Tali proteine ricombinanti possono comprendere uno o più moduli proteici da una o più proteine correlate a TGF- $\beta$ . Alcune proteine ricombinanti descritte nella presente possono essere utili come antigeni ricombinanti. Come usato nella presente, il termine "antigene ricombinante" si riferisce a una proteina ricombinante che può essere usata per immunizzare uno o più ospiti per la produzione di anticorpi diretti verso uno o più epitopi presenti su tali antigeni ricombinanti. Alcuni antigeni ricombinanti possono essere antigeni basati su cellule. Come usato nella presente, il termine "antigene basato su cellule" si riferisce a antigeni ricombinanti che vengono espressi nelle cellule per la presentazione di tali antigeni sulla superficie cellulare. Tali cellule possono essere usate per immunizzare gli ospiti per la produzione di anticorpi diretti verso tali antigeni basati su cellule.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti descritte nella presente possono essere usate come prodotti terapeutici. Le proteine ricombinanti descritte nella presente possono modulare livelli e/o attività (ad esempio segnalazione) dei fattori di crescita (ad esempio fattori di crescita comprendenti proteine correlate a TGF- $\beta$ ) su somministrazione e/o introduzione in uno o più soggetti e/o nicchie.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti descritte nella presente possono essere usate per saggiare livelli e/o attività (ad esempio segnalazione) dei fattori di crescita (ad esempio fattori di crescita comprendenti proteine correlate a TGF- $\beta$ ). Alcune proteine ricombinanti descritte nella presente possono essere usate nell'isolamento di anticorpi diretti verso proteine correlate a TGF- $\beta$ . Le proteine ricombinanti della presente descrizione possono anche essere usate come antigeni ricombinanti nello sviluppo di anticorpi di stabilizzazione [riduzione o prevenzione di dissociazione tra due agenti, (ad es. rilascio del fattore di crescita dai GPC, rilascio di GPC da una o più interazioni proteiche)] e/o di rilascio [potenziamento della dissociazione tra due agenti (ad es. rilascio del fattore di crescita dai GPC, rilascio di GPC da una o più interazioni proteiche)]. Le proteine ricombinanti della presente descrizione possono includere proteine membri della famiglia del TGF- $\beta$  come pure componenti e/o moduli proteici delle stesse. Alcune proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere prodomini senza fattori di crescita associati, mutanti deficienti per il clivaggio da parte di furina, mutanti deficienti nelle associazioni con proteine extracellulari e/o loro combinazioni.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti possono comprendere marcatori rivelabili. I marcatori rivelabili possono essere usati per permettere la rivelazione e/o l'isolamento delle proteine ricombinanti. Alcuni marcatori rivelabili possono comprendere marcatori biotina, poliistidina tag e/o flag tag. Tali tag possono essere usati per isolare le proteine taggate. Le proteine prodotte possono comprendere amminoacidi aggiuntivi codificanti per uno o più siti di clivaggio per proteasi 3C. Tali siti consentono il clivaggio in corrispondenza del sito di clivaggio per proteasi 3C su trattamento con proteasi 3C, includente, ma non limitata a proteasi 3C di rhinovirus. Tali siti di clivaggio vengono introdotti per consentire la rimozione dei marcatori rivelabili dalle proteine ricombinanti.

#### *GPC ricombinanti*

La Figura 5 è una rappresentazione schematica che rappresenta un caso di un GPC ricombinante. Proteine ricombinanti secondo la Figura 5 comprendenti proteine membri della famiglia del TGF- $\beta$  possono comprendere caratteristiche includenti, ma non limitate a regioni C-terminali del fattore di crescita maturo, regioni N-terminali del prodominio e/o siti di clivaggio della proproteina. Il sito di clivaggio di proproteina dei GPC ricombinanti del TGF- $\beta$  può, ad esempio, comprendere la sequenza consenso per la furina RXXR in cui R è arginina e X indica

residui amminoacidici che possono variare tra membri della famiglia del TGF- $\beta$ . Le sequenze del sito di clivaggio per la furina (sebbene non limitato a clivaggio tramite furina solamente e possa includere clivaggio tramite altri enzimi proproteina convertasi) per ogni membro della famiglia del TGF- $\beta$  sono indicate nella Tabella 1. GPC ricombinanti secondo il caso rappresentato nella Figura 5 possono anche comprendere uno o più residui di cisteina all'interno della e/o vicino alla regione N-terminale del prodominio. Tali residui di cisteina possono essere da circa 1 a circa 10 amminoacidi, da circa 4 a circa 15 amminoacidi, da circa 5 a circa 20 amminoacidi e/o da circa 7 a circa 50 amminoacidi dall'N-terminale del prodominio. GPC ricombinanti possono anche comprendere marcatori rivelabili. Tali marcatori rivelabili possono essere utili per la rivelazione e/o l'isolamento dei GPC ricombinanti. Marcatori rivelabili possono comprendere 2 o più residui di istidina (His). Tali marcatori rivelabili possono anche essere riferiti nella presente come tag poliistidinici. I tag poliistidinici possono includere esa istidina tag o HIS-TAG™ (EMD Biosciences, Darmstadt, Germany) comprendenti una catena di sei residui di istidina. Alcuni tag poliistidinici possono essere presenti nell'N-terminale di proteine ricombinanti descritte nella presente. Alcuni tag poliistidinici possono essere presenti nel C-terminale di proteine ricombinanti descritte nella presente. Le proteine prodotte possono comprendere ulteriori amminoacidi codificanti per uno o più siti di clivaggio per proteasi 3C. Tali siti consentono il clivaggio in corrispondenza del sito di clivaggio per proteasi 3C su trattamento con proteasi 3C, includente, ma non limitata a proteasi 3C di rhinovirus. Alcuni siti di clivaggio possono essere introdotti per consentire la rimozione dei marcatori rivelabili dalle proteine ricombinanti.

In alcuni casi della presente descrizione, i GPC ricombinanti possono comprendere mutazioni in uno o più amminoacidi rispetto alle sequenze wild-type. In alcuni casi, una o più regioni di processamento proteolitico possono essere mutate. Tali regioni possono comprendere siti di clivaggio per proproteina convertasi. Mutazioni nei siti di clivaggio per proproteina convertasi (ad esempio furina) impediscono il clivaggio enzimatico in quel sito e/o impediscono il clivaggio enzimatico dei fattori di crescita dai loro prodomini (si veda la Figura 6.) Alcuni siti di clivaggio per proproteina convertasi comprendenti le sequenze RXXR possono essere mutati in RXG (in cui X indica un sito dove i residui amminoacidici possono essere variabili). Tali mutazioni sono abbreviate nella presente come mutazioni "D2G" e possono essere resistenti al clivaggio enzimatico. In alcuni casi, siti di clivaggio

per furina comprendenti sequenze RXXR sono mutati in AXXA. Tali sequenze AXXA anche possono essere resistenti al clivaggio enzimatico.

In alcuni casi, regioni di processamento proteolitico tramite tolloide e/o proteine tolloide-simili possono essere mutate per impedire tale processamento proteolitico. In alcuni casi, possono essere mutate le regioni di processamento tramite tolloide su GDF-8 e/o GDF-11. In alcuni casi, la mutazione di residui di acido aspartico in residui di alanina all'interno di regioni di processamento tramite tolloide impedisce il processamento tramite tolloide. È stato mostrato che la mutazione di residuo di acido aspartico 76 (D76) della proproteina di GDF-8 (miostatina) impedisce l'attivazione proteolitica di GDF-8 latente (Wolfman, N.M. et al., PNAS. 2003, Oct 6. 100(26): 15842-6.) In alcuni casi, Asp 120 (D120, numero di residuo contato dalla proteina tradotta, D98 dalla proproteina di SEQ ID NO: 4) in GDF-11 può essere mutato per impedire il processamento tramite tolloide (Ge et al., 2005. Mol Cell Biol. 25(14):5846-58.)

In alcuni casi, uno o più amminoacidi possono essere mutati allo scopo di formare GPC ricombinanti con latenza ridotta. Tali mutazioni sono riferite nella presente come "mutazioni attivanti". Queste mutazioni possono introdurre una o più regioni di collisione sterica tra i prodomini e i domini di fattore di crescita del complesso. Come usato nella presente, il termine "collisione sterica", quando si fa riferimento all'interazione tra due proteine o tra due domini e/o epitopi all'interno della stessa proteina, si riferisce a un'interazione repulsiva tra tali proteine, domini e/o epitopi dovuta a una posizione sovrapposta nello spazio tridimensionale. La collisione sterica all'interno dei GPC può ridurre l'affinità tra prodomini e domini di fattore di crescita, portando a rapporti elevati tra fattore di crescita libero e fattore di crescita latente. In alcuni casi, uno o più amminoacidi possono essere mutati allo scopo di formare GPC ricombinanti con latenza aumentata. Tali mutazioni sono riferite nella presente come "mutazioni stabilizzanti". Queste mutazioni possono aumentare l'affinità tra i prodomini e i domini di fattore di crescita, comportando rapporti diminuiti tra fattore di crescita libero e fattore di crescita latente.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere qualunque delle sequenze elencate nella Tabella 6 o frammenti delle stesse.

Tabella 6. Proteine ricombinanti

Proteina	Sequenza	SEQ ID NO
proTGF- $\beta$ 1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLL MATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	1
proTGF- $\beta$ 1 C4S	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLL MATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	98
proTGF- $\beta$ 1 C4S (LAP)	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLL MATPLERAQHLQSS RHRR	99
proTGF- $\beta$ 1 D2G	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLL MATPLERAQHLQSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPK GYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPC CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	100

proTGF- $\beta$ 1 C4S D2G	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIKRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPK GYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPC CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	101
proTGF- $\beta$ 1 LAP	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRR	38
proTGF- $\beta$ 2	SLSTCSTLDMQDFMRKRIEAIKRGQILSKLKLTSPPEDYPEPE EVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKE VYKIDMPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNASNL VKAEFRVFRQLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYID SKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLH CPCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAY CFRNVQDNCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCA GACPYLWSSDTQHSRVLSTYNTINPEASASPCCVSQDLEPL TILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	2
proTGF- $\beta$ 2 C5S	SLSTSSTLDMQDFMRKRIEAIKRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEV YKIDMPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNASNLV KAEFRVFRQLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLHC PCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKS TRKKNSGKTPHLLMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAYC FRNVQDNCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCA ACPYLWSSDTQHSRVLSTYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTI LYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	102
proTGF- $\beta$ 2 LAP C5S	SLSTSSTLDMQDFMRKRIEAIKRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEV YKIDMPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNASNLV KAEFRVFRQLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLHC PCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKS TRKKNSGKTPHLLMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAYC	103

proTGF- $\beta$ 2 C5S D2G	SLSTSSTLDMQDFMRKRIEAIKRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEV YKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLV KAEFRVFRQLQNPQARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLHC PCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKS TRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRKRGALDAAYCF RNVQDNCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCAGA CPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSDLEPLTIL YYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	104
proTGF- $\beta$ 2 D2G	SLSTCSTLDMQDFMRKRIEAIKRGQILSKLKLTSPPEDYPEPE EVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKE VYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNL VKAEFRVFRQLQNPQARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYID SKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLH CPCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRKRGALDAAYC FRNVQDNCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCAG ACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSDLEPLTI LYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	105
proTGF- $\beta$ 2 LAP	SLSTCSTLDMQDFMRKRIEAIKRGQILSKLKLTSPPEDYPEPE EVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKE VYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNL VKAEFRVFRQLQNPQARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYID SKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLH CPCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRKRR	39
proTGF- $\beta$ 3	SLSLSTCTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIH PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHPHLILMMIPPHRLDNPQGGQRKKRALDTNY CFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFC GPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVSDLEPL TILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSKCS	3

proTGF- $\beta$ 3 C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIH PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGGQRKKRALDTNY CFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCS GPCPYLRSADTTHTSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPL TILYYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS	106
proTGF- $\beta$ 3 LAP C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIH PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGGQRKKR	107
proTGF- $\beta$ 3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIH PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGGQRKGALDTNYC FRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGP CPYLRSADTTHTSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTIL YYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS	108
proTGF- $\beta$ 3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIH PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGGQRKGALDTNYC FRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGP CPYLRSADTTHTSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTIL YYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS	109

proTGF- $\beta$ 3 LAP	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIH PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGGQRKKR	40
--------------------------	---	----

In alcuni casi, le mutazioni attivanti possono comprendere residui critici per la dimerizzazione di LAP o di proteine LAP-simili. Alcune mutazioni attivanti possono comprendere isoforme di TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e/o TGF- $\beta$ 3). GPC mutanti con mutazioni attivanti possono comprendere mutazioni che corrispondono a mutazioni identificate nella malattia di Camurati-Engelmann (CED). Soggetti affetti da CED tipicamente hanno difetti genetici in TGF- $\beta$ 1. Mutazioni identificate in tali soggetti includono, ma non sono limitate a mutazioni nei residui Y81, R218, H222, C223 e C225. I residui C223 e C225 sono necessari per la formazione di legami disolfuro nella dimerizzazione di LAP. Mutazioni per R218, H222, C223 e/o C225 possono portare a formazione di legami disolfuro e dimerizzazione di LAP indebolita o perturbata. In alcuni casi, mutazioni della CED portano a elevato rilascio di TGF- $\beta$  e/o aumentata attività di TGF- $\beta$ . In alcuni casi, GPC ricombinanti comprendenti TGF- $\beta$ 1 con mutazioni della CED comprendono le sequenze elencate nella Tabella 7. Le sostituzioni amminoacidiche indicate in queste proteine riflettono il numero di residuo come contato dall'inizio della proteina tradotta (prima della rimozione della sequenza segnale di secrezione).

**Tabella 7. GPC ricombinanti con mutazioni di Camurati-Engelmann**

Proteina	Sequenza	SEQ ID NO
proTGF- $\beta$ 1 Y81H	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALHNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVQHVELYQKYSNNSWRYLNSNLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLL MATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	110

proTGF- $\beta$ 1 R218C	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFCLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMTPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	111
proTGF- $\beta$ 1 H222D	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSADCSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMTPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	112
proTGF- $\beta$ 1 C223R	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHRSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMTPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	113
proTGF- $\beta$ 1 C225R	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSRDRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMTPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	114

proTGF- $\beta$ 1 C223R C225R	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHRSDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	115
-------------------------------------	--	-----

I GPC comprendenti mutazioni della CED possono trovare diversi usi nel contesto della presente invenzione. In alcuni casi, tali GPC possono essere usati per produrre proteine ricombinanti comprendenti LAP o domini LAP-simili complessati con GARP. La co-espressione dell'intero GPC con GARP può essere necessaria in alcuni casi, per un'associazione e un ripiegamento corretti. Attraverso l'espressione dei GPC comprendenti mutazioni della CED, i fattori di crescita possono essere in grado di dissociarsi lasciando il complesso GARP-LAP desiderato. Le mutazioni Y81H possono essere utili a questo proposito. Le mutazioni Y81H portano al rilascio del fattore di crescita, ma non disturbano il legame disolfuro tra monomeri di LAP nei residui C223 e C225. Perciò, i complessi GARP-LAP formati attraverso l'espressione di mutanti GPC Y81H possono comprendere dimeri di LAP intatti in cui i fattori di crescita si sono dissociati. In alcuni casi, pure la co-espressione aggiuntiva o l'aggiunta di furina in eccesso durante il processo di produzione può accrescere la dissociazione del fattore di crescita.

I GPC comprendenti mutazioni della CED possono essere espressi per consentire la produzione e il rilascio del fattore di crescita maturo. Alcuni GPC senza fattori di crescita espressi secondo questo metodo possono essere usati per valutare la reattività degli anticorpi, per esempio in saggi di immunoassorbente legato ad enzima (ELISA). Alcuni GPC comprendenti mutazioni della CED possono essere espressi per consentire la produzione e il rilascio di fattori di crescita legati a GPC. GPC comprendenti mutazioni della CED possono essere espressi per consentire la produzione e il rilascio di proteine chimeriche comprendenti il LAP da TGF- $\beta$ 1 (o moduli proteici o frammenti dello stesso) espresso con uno o più moduli proteici da altri membri della famiglia del TGF- $\beta$ . Tali proteine chimeriche possono comprendere LAP da TGF- $\beta$ 1 e domini di fattore di crescita TGF- $\beta$ 2 o TGF- $\beta$ 3.

Il clivaggio tramite furina di proteine ricombinanti della descrizione può in alcuni casi verificarsi a livello intracellulare. In alcuni casi il clivaggio tramite furina di proteine ricombinanti della descrizione può verificarsi a

livello extracellulare.

In alcuni casi, i GPC ricombinanti della presente descrizione possono comprendere mutazioni in una o più regioni N-terminali per le associazioni extracellulari. Come usato nella presente, il termine "regione N-terminale per l'associazione extracellulare" si riferisce a regioni in corrispondenza delle o vicino agli N-terminali della proteina che possono essere necessarie per le associazioni extracellulari con una o più regioni N-terminali. Tali regioni possono comprendere almeno il primo residuo N-terminale, almeno i primi 5 residui N-terminali, almeno i primi 10 residui N-terminali, almeno i primi 20 residui amminoacidici e/o almeno i primi 50 residui amminoacidici. Alcune mutazioni possono comprendere da circa 1 residuo amminoacidico a circa 30 residui amminoacidici, da circa 5 residui amminoacidici a circa 40 residui amminoacidici e/o da circa 10 residui amminoacidici a circa 50 residui amminoacidici in corrispondenza degli o vicino agli N-terminali della proteina. Tali regioni possono comprendere residui per l'associazione con LTBP, fibrillina e/o GARP. In alcuni casi, uno o più residui di cisteina presenti all'interno delle e/o vicino alle regioni N-terminali per le associazioni extracellulari possono essere necessari per tali associazioni. In alcuni casi, residui di cisteina presenti all'interno delle e/o vicino alle regioni N-terminali per le associazioni extracellulari sono presenti in circa i primi 2 residui N-terminali, circa i primi 3 residui N-terminali, circa i primi 4 residui N-terminali, circa i primi 5 residui N-terminali, circa i primi 6 residui N-terminali, circa i primi 7 residui N-terminali e/o almeno i primi 30 residui N-terminali. Alcune mutazioni in una o più regioni N-terminali per le associazioni extracellulari comprendono sostituzione e/o delezione di tali residui di cisteina. Tali mutazioni possono modulare l'associazione dei GPC e/o dei prodomini con una o più proteine extracellulari, includenti, ma non limitate a LTBP, fibrilline e/o GARP. Queste mutazioni possono anche comprendere la sostituzione di una o più cisteine con un altro amminoacido. Le sostituzioni di residuo di cisteina sono abbreviate nella presente come "C#X" in cui # rappresenta il numero di residuo [contando dall'N-terminale della pro-proteina (senza il peptide segnale)] del residuo di cisteina originario e X rappresenta il codice di amminoacido a una lettera per l'amminoacido che viene usato per la sostituzione. Qualunque amminoacido può essere usato per tali sostituzioni. In alcuni casi, residui di serina (S) sono usati per sostituire residui di cisteina. Esempi non limitanti di tali mutazioni possono includere C4S, C5S e/o C7S. Nei GPC ricombinanti comprendenti

regioni di prodominio N-terminali da TGF- $\beta$ 1, possono essere mutati residui di cisteina che si trovano nella posizione amminoacidica numero 4. Nei GPC ricombinanti comprendenti regioni di prodominio N-terminali da TGF- $\beta$ 2, possono essere mutati residui di cisteina che si trovano nella posizione amminoacidica numero 5. Nei GPC ricombinanti comprendenti regioni di prodominio N-terminali da TGF- $\beta$ 3, possono essere mutati residui di cisteina in posizione 7.

In alcuni casi, una o più cisteine in una o più altre regioni dei GPC possono essere sostituite o delete. In alcuni casi, tali modificazioni di GPC possono promuovere il rilascio di fattore di crescita maturo dai prodomini. In alcuni casi, tali cisteine possono includere quelle presenti in uno o più di fattori di crescita maturi, alfa eliciche 2, ganci, lazi di latenza e/o regioni cravatta a farfalla.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere moduli proteici derivati da una o più specie, inclusi mammiferi, includenti, ma non limitati a topi, ratti, conigli, maiali, scimmie e/o esseri umani. Le proteine ricombinanti possono comprendere uno o più amminoacidi da una o più sequenze amminoacidiche derivate da una o più sequenze di proteine non umane elencate nella Tabella 8. In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere tali sequenze con o senza il peptide segnale nativo.

**Tabella 8. Proteine Non-umane**

<b>Proteina</b>	<b>Specie</b>	<b>Sequenza</b>	<b>SEQ ID NO</b>
proTGF- $\beta$ 1	Topo	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEV TRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPP LLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRL LTPTDTPWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFSAHCS CDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLMAT PLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNPASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	116

proTGF- $\beta$ 1	Cyno	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLVQHVLYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCS DSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMAT PLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	117
proTGF- $\beta$ 1 C4S (LAP)	Topo	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEV TRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPP LLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRL LTPDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFSAHCS CDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMAT PLERAQHLHSSRHRR	118
proTGF- $\beta$ 1 C4S (LAP)	Cyno	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLVQHVLYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCS DSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMAT PLERAQHLQSSRHRR	119
proTGF- $\beta$ 1 C4S D2G	Topo	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEV TRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPP LLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRL LTPDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFSAHCS CDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMAT PLERAQHLHSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFR KDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS	120
proTGF- $\beta$ 1 C4S	Topo	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEV TRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPP LLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRL LTPDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFSAHCS CDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMAT PLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	121

proTGF- $\beta$ 1 C4S	Cyno	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMEVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLVQHVVELYQKYSNNSWRYL SNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMAT PLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	122
proTGF- $\beta$ 1 C4S D2G	Cyno	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMEVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLVQHVVELYQKYSNNSWRYL SNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMAT PLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFR KDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL LYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQL SNMIVRSCKCS	123
LRR32	Cyno	MSPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVACKMVDKVKVSCQG LGLLQVPLVLPDTELDLSGNQLRSILASPLGFYALRH LDLSTNEINFLQPGAFQALTHEHLSLAHNRLAMATALS AGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSL AENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFE GLPHLTHLNL SRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQ TASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLS NNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSTPNGNVSARP LSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTF EARRSGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRLLLL QGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPNEP GPASCVAFSGIASLRSLSLVDNEIELLRAGAFHTPLTEL DLSSNPGLVATGALTGLEASLEVLALQGNGLTVLQVD LPCFICKRLNLAENRSLHLPWTQAVSLEVLDLRNNSF SLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAQLH QGRVDV DATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLK NINLIILTFILVSAILLTTLATCCCVRRQKFNQYKA	124

proGDF-8	Topo	<p>NEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILS  KLRLLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQYDVQRDDSS  DGSLEDDDYHATTEITITMPTESDFLMQADGKPKCCFFK  FSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPM  KDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQ  PESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKV  TDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGW  DWIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTLHVHQNPR  GSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRC  GCS</p>	125
proGDF-8 AxxA	Topo	<p>NEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILS  KLRLLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQYDVQRDDSS  DGSLEDDDYHATTEITITMPTESDFLMQADGKPKCCFFK  FSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPM  KDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQ  PESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKV  TDTPKASRADFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGW  DWIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTLHVHQNPR  GSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRC  GCS</p>	126
proGDF-8 D76A	Topo	<p>NEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILS  KLRLLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQYDVQRADSS  DGSLEDDDYHATTEITITMPTESDFLMQADGKPKCCFFK  FSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPM  KDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQ  PESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKV  TDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGW  DWIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTLHVHQNPR  GSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRC  GCS</p>	127
proGDF-8 AxxA D76A	Topo	<p>NEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILS  KLRLLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQYDVQRADSS  DGSLEDDDYHATTEITITMPTESDFLMQADGKPKCCFFK  FSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPM  KDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQ  PESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKV  TDTPKASRADFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGW  DWIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTLHVHQNPR  GSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRC  GCS</p>	128

GDF-8 prodominio	Topo	NEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILS KLRLLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQYDVQRDDSS DGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQADGKPKCCFFK FSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPM KDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQ PESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFLEVKV TDTPKRSRR	129
GDF-8 prodominio D76A	Topo	NEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILS KLRLLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQYDVQRADSS DGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQADGKPKCCFFK FSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPM KDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQ PESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFLEVKV TDTPKRSRR	130
proGDF-8	Cyno	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSK LRLETAPNISKDAIRQLLKPAPPLRELIDQYDVQRDDSSD GSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKF SSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMK DGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQP ESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFLEVKVT DTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD WIAPKRYKANYCSGECEVFVFLQKYPHTHLVHQANPRG SAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRCG CS	131
proGDF-8 AxxA	Cyno	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSK LRLETAPNISKDAIRQLLKPAPPLRELIDQYDVQRDDSSD GSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKF SSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMK DGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQP ESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFLEVKVT DTPKASRADFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD WIAPKRYKANYCSGECEVFVFLQKYPHTHLVHQANPRG SAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRCG CS	132
proGDF-8 D76A	Cyno	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSK LRLETAPNISKDAIRQLLKPAPPLRELIDQYDVQRADSSD GSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKF SSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMK DGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQP ESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFLEVKVT DTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD WIAPKRYKANYCSGECEVFVFLQKYPHTHLVHQANPRG SAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRCG CS	133

proGDF-8 AxxA D76A	Cyno	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSK LRLETAPNISKDAIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRADSSD GSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKF SSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMK DGTRYTGIRSLKLDMPNPGTIWQSIDVKTVLQNWLKQP ESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFLEVKVT DTPKASRADFLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD WIIAPKRYKANYCSGECEVFLQKYPHTHLVHQANPRG SAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCG CS	134
GDF-8 prodominio	Cyno	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSK LRLETAPNISKDAIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSD GSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKF SSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMK DGTRYTGIRSLKLDMPNPGTIWQSIDVKTVLQNWLKQP ESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFLEVKVT DTPKRSRR	135
GDF-8 prodominio D76A	Cyno	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSK LRLETAPNISKDAIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRADSSD GSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKF SSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMK DGTRYTGIRSLKLDMPNPGTIWQSIDVKTVLQNWLKQP ESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGLNPFLEVKVT DTPKRSRR	136
proGDF-11	Topo	AEGPAAAAAAAAAAGVGGERSSRPAPSAPPEPDGCPV CVWRQHSRELRLESIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLL PKAPPLQQILDHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVIS MAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLW VYLRPVPRPATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIR IRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHWSFRQPQSNWGIEIN AFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKRSRRN LGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKA NYCSGQCEYMFQMOKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPT KMSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMVVDRCGCS	137
proGDF-11 AxxA	Topo	AEGPAAAAAAAAAAGVGGERSSRPAPSAPPEPDGCPV CVWRQHSRELRLESIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLL PKAPPLQQILDHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVIS MAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLW VYLRPVPRPATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIR IRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHWSFRQPQSNWGIEIN AFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKASRA NLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGQCEYMFQMOKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTP TKMSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMVVDRCGCS	138

proGDF-11 AxxA D96A	Topo	AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSSRPAPSAPPEPDGCPV CVWRQHSRELRLESIKSQLSKLRLKEAPNISREVVKQLL PKAPPLQQILDLDHDFQGAALQPEDFLEEDEYHATTETVIS MAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLW VYLRPVPRPATVYLLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIR IRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHWSFRQPQSNWGIEIN AFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKASRA NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTP TKMSPINMLYFNDDKQIIYGKIPGMVVDRCGCS	139
proGDF-11 D96A	Topo	AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSSRPAPSAPPEPDGCPV CVWRQHSRELRLESIKSQLSKLRLKEAPNISREVVKQLL PKAPPLQQILDLDHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVIS MAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLW VYLRPVPRPATVYLLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIR IRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHWSFRQPQSNWGIEIN AFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKRSRR LGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKA NYCSGQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPT KMSPINMLYFNDDKQIIYGKIPGMVVDRCGCS	140
GDF-11 prodominio	Topo	AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSSRPAPSAPPEPDGCPV CVWRQHSRELRLESIKSQLSKLRLKEAPNISREVVKQLL PKAPPLQQILDLDHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVIS MAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLW VYLRPVPRPATVYLLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIR IRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHWSFRQPQSNWGIEIN AFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKRSRR	141
GDF-11 prodominio D96A	Topo	AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSSRPAPSAPPEPDGCPV CVWRQHSRELRLESIKSQLSKLRLKEAPNISREVVKQLL PKAPPLQQILDLDHDFQGAALQPEDFLEEDEYHATTETVIS MAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLW VYLRPVPRPATVYLLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIR IRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHWSFRQPQSNWGIEIN AFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKRSRR	142

LTBP3	CYNO	MPGPRGAPGGLAPEMRGAGAAGLLALLLLGLGGRVE GGPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQC RDSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCP LPC NGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGP GLSRAGALSTGALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPP GPGEPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVH HPPEASVQVHRIESSNAEGAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQ KPLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWG QSKCHKCPQLQYTG VQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLN STHCQDINECAMPGVCRHGDCLNPNPGSYRCVPPGHSL GPSRTQCIADKPEEKSLCFRLVSPEHQCHPLTTRLTRQL CCCSVGKAWGARCQRCPADGTAAFKEICPAGKGYHILT SHQTLTIQESDFSLFLHPDGPPKQQLPESPSQAPPEDT EEERGVTDSVSEERSVQQSHPTATTSPARPYPELISRPS PPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVETDECRNLQNICG HGECVPGPPDYSCHCNPGYRSHPOHR YCVDVNECEAEP CGPGRGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDL NECAKPHLCGDGGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPP VCEDIDECRDPSSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQG GGACRDVNECAEGSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAP APDGRSCVDVDECEAGDVC DNGICTNTPGSFQCQLSG YHLRDRSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCP QGHRLVGGRKCDIDECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYV CVCDEGFTPTQDQHGC EEVEQPHHKKECYLNFD DTVFC DSVLATNVTQEQCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEF HSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGAEICK EGKCVNTQPGYECYCKQGFYDGNLLECV DVDECLDE SNCRNGVCENTRGGYRC ACTPPAEYSPAQRQCLSPEEM DVDECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGR DCQLPESPAERAPER RDVCWSQRGEDGMCAGPQAGPA LTFDDCCCRQGRGWAQCRPCPPRGAGSQCPTSQSESN SFWDTSPLLL GKPRRDEDSSEEDSDECR CVSGRCVPRPG GAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSE RCVNTSGSFRVCVCKAGFARSRPHGACVPQRRR	143
LTBP3	Topo	MPGPRGAAHGLAPAMHQAGALGLLALLLLALLGPGGG AEGGPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSAFRVVVCP LPC MNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAAGTGAGTGSSG PGLARTGAMSTGPLPPLAPEGESVASKHAIYAVQVIADP PGPGEPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVH HPPEASVQVHRIEGPNAEGPASSQHLLPHKPPHPRPPTQ KPLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWG QSKCHKCPQLQYTG VQKPPVVRGEVGADCPQGYKRLN STHCQDINECAMPGNVCHGDCLNPNPGSYRCVPPGHSL GPLAAQCIADKPEEKSLCFRLVSTEHQCHPLTTRLTRQL LCCCSVGKAWGARCQRCPADGTAAFKEICPGKGYHILT SHQTLTIQESDFSLFLHPDGPPKQQLPESPSRAPPLEDT	144

		<p>EEERGVTMDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPPRPYPELISRPS  PPTFHRFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGH  GQCVPGPSDYSCHCNAGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPC  GPGKGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLN  ECAKPHLCGGDFCINFPGHYKNCNCPGYRLKASRPPIC  EDIDECRDPSTCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGG  ACRDVNECSEGTPCSPGWCENLPGSYRCTCAQYEPAQD  GLSCIDVDECEAGKVCQDGICTNTPGSFQCQCLSGYHLS  RDRSRCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHR  LVGGRKCKKDIDECSQDPGLCLPHACENLQGSYVCVCD  EGFTLTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFD DTVFCDSVL  ATNVTQOECCCSL GAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLV  PDGKRLHSGQQHCELCIPAHRDIDECILFGAEICKEGKCV  NTQPGYECYCKQGFYDGNLLECVDVDECLDESNCRN  GVCENTRGGYRCACPPAEYSPAQAQCLIPERWSTPQR  DVKCAGASEERTACVWGPWAGPALTFDDCCCRQPRLG  TQCRPCPPRGTSQCPTSQSESNSFWDTSPLLL GKSPRDE  DSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASR  ARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGF  TRSRPHGPACLSAAADDAIAHTSVIDHRGYFH</p>	
<p>LTBP1</p>	<p>Cyno</p>	<p>MAGAWLRWGLLLWAGLLASSAHGRLRRITYVVHPGPG  LAAGALPLSGPPRSRTFNVALNARYSRSSAAAGAPSRAS  PGVPSERTRRTSKPGGAALQGLRPPPPPPPEPARPAAPGG  QLHPKPGGHPAAAPFAKQGRQVVRSKVPQETQSSGGSR  LQVHQKQQLQGVNVCGGRCCHGWSKAPGSQRCTKRSC  VPPCQNGGMCLRPQLCVCKPGTKGKACETIAAQDTSSP  VFGGQSPGAASSWGPPEQA AKHTSSKADTLPRVSPVA  QMTLTLKPKPSVGLPQQIHSQVTPLSSQSVMIHHSQTQE  YVLKPKYFPAQKGISGEQSTEGSFPLRYVQDQVAAPFQL  SNHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTLLISE  NGHAADTLTATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRDKCCQCP  NFTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTH  TLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQVSR  IDGPTGQKTKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQ  QVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQED  CCGTVGTSWGFKCQKCPKPSYHGYNQMMECLPGYK  RVNNTFCQDINECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIG  FGDPTFSSCVPDPPVISEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSV  HLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCLPGTAAAFKEICPGGM  GYTVSGVHRRRPIHHHVKGKGPVFKPKNTQPVAKSTHP  PPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEIPLS  DQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVIEKTSPPVVE  VAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINL  PVRYTCICYEGYKFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGR  ENTECSFLCICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGE  HCVNTVGAFRCEYCDGSRMTQRGRCEDIDECLNPSTC  PDEQCVNSPGSYQCVPTGFRGWNGQCLDVDECLPN  VCTNGDCSNLEGSYMCCHKGYTRTPDHKCKDIDECQ  QGNLCVNGQCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDID  ECQHHLCAHGQCRNTEGSFQCVCQDQGYRASGLGDHC</p>	<p>145</p>

		<p>EDINECLEDKSVCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDN          KTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSIS          ADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNNTAGSFRCLCYQG          FQAPQDGGQCVDVNECELLSGVCGEAFCEVVEGSFLCV          CADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVEQPKEEKKECYYN          LNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTSGAGWGDNCEIFPCP          VLGTAEFTEMCPKKGKGFVPAGESSEAGGENYKDADEC          LLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYPVKLQCF          DMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEK          RCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGK          QTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNIP          VTGRRQPYGRDALVDFSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEE          LQAEECGILNGCENGRVVRVQEGYTCDCFDGYHLDTAK          MTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCLCLPG          YVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSLE</p>	
<p>LTBP1S</p>	<p>topo</p>	<p>NHTGRIKVVFTPSICKVVTCTKGNCQNSCQKGNNTTLISE          NGHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPP          NFTGKLCQIPVLGASMPKLYQHAQQGKALGSHVIHST          HTLPLTMTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQV          SRIDSPGGQKVKEAQPQSQVSYQGLPVQKTQTVHSTY          SHQQLIPHYYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSK          QEDCCGTGVTSGWGFNKCQKCPKKQSYHGYTQMMECL          QGYKRVNNTFCQDINECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCS          CKMGFGPDPFTSSCVPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCM          HPLSVHLTKQICCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEIC          PGGMGYTVSGVHRRRPIHQHIGKEAVYVVKPKNTQPVAK          STHPPPLPAKEEPVEALTSSWEHGPRGAEPEVVTAPPEK          EIPSLDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVVVEKTS          PVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAG          HCINLPVRYTCICYEGYKFSEQLRKCVDIDECAQVRHLC          SQGRCENTEGSFLCVCPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPD          MCRDGRCINTAGAFRCEYCDSGYRMSRRGYCEDIDEC          KPSTCPEEQCVNTPGSYQCVCTEGFRGWNGQCLDVDE          CLQPKVCTNGSCTNLEGSYMCSCHRGYSPTDHRHCQD          IDECQQGNLCMNGQCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKD          QCEDIDECEHHHLCSHGQCRNTEGSFQVCNQGYSRASV          LGDHCEDINECLEDSVCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQ          LNDNKGCDINECAQPGLCGSHGECLNTQGSFHCVCEQ          GFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNNTAGSFRCL          CYQGFQAPQDGGQCVDVNECELLSGVCGEAFCEVVEGS          FLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTEDSGVDRQPREEKK          ECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTSGAGWGDNC          EIFPCPVQGTAEFTEMCPRGKGLVPAGESSTDTGGENYK          DADECLLFGEEICKNGYCLNTQPGYECYCKQGTYYPV          KLQCFDMDECQDPNSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVL          DASEKRCVQPTESNEQIEETDVYQDLCWEHLSEEYVCSR          PLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYA          QLCNIPVTGRRRQPYGRDALVDFSEQYGPETDPYFIQDRF          LNSFEELQAEECGILNGCENGRVVRVQEGYTCDCFDGY</p>	<p>146</p>

		HLDMAKMTCDVDVNECSELNNRMSLCKNAKCINTEGSY KCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNSALNLDKESDLE	
GARP	topo	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALY LSGNLQSIQSVLPLGFYALRHLDLSDNQISFLQAGVFQA LPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLDLSG NSLHGNIIVERLLGETPRLRRTLSLAENSLTRLARHTFWG MPAVEQLDLHSNVLMIEDGAFEALPHLTHLNLSRNSL TCISDFSLQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWL DLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSE DLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIE LVPASFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLL DLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLQLQDNALQELPPYTFA SLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLH VLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATG ALVGLEASLEVELELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAE NQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLET SLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVATQDL ICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGGLKNVNLILLLSFTLVS AIVLTTLATICFLRRQKLSQYKA	147
sGARP	topo	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALY LSGNLQSIQSVLPLGFYALRHLDLSDNQISFLQAGVFQA LPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLDLSG NSLHGNIIVERLLGETPRLRRTLSLAENSLTRLARHTFWG MPAVEQLDLHSNVLMIEDGAFEALPHLTHLNLSRNSL TCISDFSLQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWL DLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSE DLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIE LVPASFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLL DLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLQLQDNALQELPPYTFA SLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLH VLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATG ALVGLEASLEVELELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAE NQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLET SLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVATQDL ICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGGLKNVN	148

LRR33	topo	<p>           WRSRMLILDANPLKDLWNHSLQAYPRENLSLHSCHLDRISHYAFREQHLRNLVLADNRLSENYKESAAALHTLLGLRRDLDSGNLSTEDMAALMLQNLSSLEVVSARNTLMRLDDSFEGLEHLVELDLQRNYIFEIEGGAFDGLTELRRLNLA YNNLPCIVDFSLTQLRFLNVSYNILEWFLAAREEVA FELEILDLSHNQLLFFPLLQCGKLTLLQDNNMGFYREL YNTSSPQEMVAQFLVDGNVTNITTVNLWEEFSSSDL SALRFLDMSQNQFRHLPDGFLLKTPSLSHLNLNQNCLKMLHIREHEPPGALTELDLSHNQLAELHLAPGLTGSLRNL RVFNLSNQLLGVPTGLFDNASSITTIDMSHNQISLCPQM VPVDWEGPPSCVDFRNMGSLRSLDGCGLKALQDCPF QGTSLTHLDLSSNWGVNLNGSISPLWAVAPTLQVLSLRD VGLGSGAAEMDFSAFGNLRALDLSGNLSTFPKFKGSLA LRTLDLRRNSLTALPQRVVSEQPLRGLQTIYLSQNPYDC CGVEGWGALQQHFKTVAADLSMVTCLNLSSKIVRVVPELPE GLPQGCKWEQVDTGLFYLVLILPSCLTLLVACTVVFLTF KKPLLQVIKSRCHWSSY         </p>	149
sLRR33	topo	<p>           WRSRMLILDANPLKDLWNHSLQAYPRENLSLHSCHLDRISHYAFREQHLRNLVLADNRLSENYKESAAALHTLLGLRRDLDSGNLSTEDMAALMLQNLSSLEVVSARNTLMRLDDSFEGLEHLVELDLQRNYIFEIEGGAFDGLTELRRLNLA YNNLPCIVDFSLTQLRFLNVSYNILEWFLAAREEVA FELEILDLSHNQLLFFPLLQCGKLTLLQDNNMGFYREL YNTSSPQEMVAQFLVDGNVTNITTVNLWEEFSSSDL SALRFLDMSQNQFRHLPDGFLLKTPSLSHLNLNQNCLKMLHIREHEPPGALTELDLSHNQLAELHLAPGLTGSLRNL RVFNLSNQLLGVPTGLFDNASSITTIDMSHNQISLCPQM VPVDWEGPPSCVDFRNMGSLRSLDGCGLKALQDCPF QGTSLTHLDLSSNWGVNLNGSISPLWAVAPTLQVLSLRD VGLGSGAAEMDFSAFGNLRALDLSGNLSTFPKFKGSLA LRTLDLRRNSLTALPQRVVSEQPLRGLQTIYLSQNPYDC CGVEGWGALQQHFKTVAADLSMVTCLNLSSKIVRVVPELPE GLPQGCKWEQVDTGL         </p>	150

LRR33	Cyno	WRDRSVTATAASQRGCKLVGGDTDCRGQSLASVPSSLP PHARTLILDANPLKALWNHSLQPYLLESLSLHSCHLERI GRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYKETAALHTLPGL QTLDSLGNLSTEDMAALMLQNLSSLQSVSLARNTIMRL DDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLTELRLHLNL AYNNLPCIVDFGLTQLRSLNVSYNVLEWFLAAGGEEAF ELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLHTLLLRDNNMGFYRD LYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVNLWEEFSSSDLA DLRFLDMSQNQFQYLPDGFRLKMPSSLSHLNLNQNCLMT LHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLPGLASCLGSLRL FNLSSNQLLGVPPLFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAA SDRVGPPSCVDFRNMAASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGT SLTSLDLSSNWGVLNGLAPLRDVAPMLQVLSLRNMGL HSNFMALDFSGFGNLRDLDSLGNCLTTFPRFGGSLALET DLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGV DGWGALQQGQTVADWATVTCNLSSKIIRLAELPGGVPR DCKWERLDLGLLVLILPSCLTLLVACTLIVLTFKKPLL QVIKSRCHWSSVY	151
sLRR33	Cyno	WRDRSVTATAASQRGCKLVGGDTDCRGQSLASVPSSLP PHARTLILDANPLKALWNHSLQPYLLESLSLHSCHLERI GRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYKETAALHTLPGL QTLDSLGNLSTEDMAALMLQNLSSLQSVSLARNTIMRL DDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLTELRLHLNL AYNNLPCIVDFGLTQLRSLNVSYNVLEWFLAAGGEEAF ELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLHTLLLRDNNMGFYRD LYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVNLWEEFSSSDLA DLRFLDMSQNQFQYLPDGFRLKMPSSLSHLNLNQNCLMT LHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLPGLASCLGSLRL FNLSSNQLLGVPPLFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAA SDRVGPPSCVDFRNMAASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGT SLTSLDLSSNWGVLNGLAPLRDVAPMLQVLSLRNMGL HSNFMALDFSGFGNLRDLDSLGNCLTTFPRFGGSLALET DLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGV DGWGALQQGQTVADWATVTCNLSSKIIRLAELPGGVPR DCKWERLDLGL	152

In alcuni casi, le proteine ricombinanti possono essere combinate e/o complessate con uno o più componenti ricombinanti aggiuntivi. Tali componenti possono includere proteine extracellulari note associarsi con GPC includenti, ma non limitate a LTBP, fibrilline, perlecano, proteine GASP1/2, follistatina, gene correlato alla follistatina (FLRG), decorina e/o GARP (incluse, ma non limitate a forme ricombinanti di tali proteine). Alcuni GPC ricombinanti della presente descrizione devono essere co-espressi con una o più di tali proteine extracellulari per un'espressione e/o un ripiegamento corretti.

In alcuni casi, le LTBP complessate possono includere, ma non sono limitate a LTBP1, LTBP2, LTBP3 e/o

LTBP4. Le LTBP complessate possono comprendere frammenti e/o mutazioni di LTBP. Alcune forme ricombinanti di LTBP complessate con GPC ricombinanti possono comprendere varianti di splicing alternativo delle LTBP. Alcune tali varianti di LTBP1 sono accorciate in corrispondenza dell'N-terminale, riferite nella presente come LTBP1S. Alcune proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere LTBP, frammenti o mutanti delle stesse comprendenti le sequenze amminoacidiche elencate nella Tabella 9.

**Tabella 9. Sequenze di LTBP**

<b>Proteina</b>	<b>Sequenza</b>	<b>SEQ ID NO</b>
LTBP1 1265-1443	NECELLSGVCGEAFCEVVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQC RSRTSTDLDVDVDQPKKEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNV TKQECCCTSGVGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTMCPKGKGF VPAGESSEAGGENYKDADECLFGQEICKNGFCLNTRPGY ECYCKQGTYYDPVKLQCF	153
LTBP1 1265-1698	NECELLSGVCGEAFCEVVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQC RSRTSTDLDVDVDQPKKEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNV TKQECCCTSGVGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTMCPKGKGF VPAGESSEAGGENYKDADECLFGQEICKNGFCLNTRPGY ECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGS YNCFCVHPMVLDAEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWE HLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPL KDSDDYAOLCNIPVTGRROPYGRDALVDFSEFOYTPFADPY FIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCENGRVQEGYTCDCF DGYHLDTAKMTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTDGS YKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSLE	154

<p>LTBP1 809-1698</p>	<p>PSLDQEKTklepgqpqlspgistiHLHPQFPVIEKTSPVPV          EVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLP          VRYTCICYEGYRFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSSQGRCE          TEGSFLCICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEHCVN          TVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDIDELNPSTCPDEQCV          NSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLPNVCANGDC          SNLEGSYMCSCHKGYTRTPDHKHCRDIDECQGNLCVNG          QCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHRHLCAH          GQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDELEDKSV          QRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLC          GPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDECVNNTV          CDSHGFCNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGGQCVDVNECEL          LSGVCGEAFCEVVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTS          TDLDVDVDQPKKEKKECYNLNDAASLCDNVLAPNVTKQE          CCCTSGVGGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTEMCPKGGKGFVPA          ESSSEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYC          KQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCF          CTHPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDE          YVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPLKDSDD          YAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQYTPADPYFIQDRF          LNSFEELQAECEGILNGCENGRCVVRVQEGYTCDFDGYHL          DTAKMTCVDVNECEDELNNRMSLCKNAKCINTDGSYKCLC          LPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSLE</p>	<p>155</p>
<p>LTBP1S</p>	<p>NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTTLISENGH          AADTLTATNFRVVICHLPNMGGQCSSRDKCQCPPNFTGK          LCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVT          SQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPPEASVQIHQVSRIDGPTGQK          TKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHYVPA          AKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTGTSWGF          NKCQKCPKPSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTFCQDINEC          QLQGVCPNGECLNMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVDP          PVEIIEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCSVGKAWG          PHCEKPLPGTAAFKEICPGMGYTVSGVHRRRPIHHHV          KGPVFKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTSREHGP          GVAEPEVATAPPEKEIPSLDQEKTklepgqpqlspgistiHLH          PQFPVIEKTSPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECT          VNPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYRFSEQQRKCVDIDEC          TQVQHLCSSQGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNCIDVDE          CLRPDVCGEHCVNTVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCE          DDECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDV          DECLPNVCANGDCSNLEGSYMCSCHKGYTRTPDHKHCR          DIDECQGNLCVNGQCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQ          CEDIDECQHRHLCAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLD          HCEDELEDKSVQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDN          KTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSISAD          GRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCNTAGSFRCLCYQGFQAP          QDGGQCVDVNECELLSGVCGEAFCEVVEGSFLCVCADEN</p>	<p>156</p>

	<p>QEYSPMTGQCRSRTSTDLDVDVDQPKKEKKECYYNLNDAS  LCDNVLAPNVTKQECCCTSGVGVGDNCEIFPCVLTAEF  TEMCPKKGKGFVPAGESSEAGGENYKDADECLLFGQEICK  NGFCLNTRPGYECYCKQGTYYPVKLQCFDMDECQDPSS  CIDGQCVNTEGSYCNFCFTHPMVLDASEKRCIRPAESNEQIE  ETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVVGKQTTYTECCCLYGEA  WGMQCALCPLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDF  SEQYTPEADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCENGRCVR  VQEGYTCDCFDGYHLDTAKMTCVDVNECDELNNRMSLCK  NAKCINTDGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDS  DLE</p>	
LTBP3	<p>GPAGERGAGGGGALARERFKVVVFAPVICKRTCLKGQCRDS  CQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVCPLPCMNGGQC  SSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLSRTGA  LSTGALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQ  HAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRI  ESSNAESAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQ  PCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTG  QKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCR  HGDCLNPNPGSYRCVCPGHS LGPSRTQCIADKPEEKSLCFR  LVSPEHQCHPLTTRLTRQLCCCSV GKA WGARCQRCPD  TAAFKEICPAGKGYHILTSHTLTIQGESDFSLFLHPDGPPK  QAALPEPSQAPPPEDTEERGVTTDSPVSEERSVQOSHPTA  TTTTPARPYELISRPSPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTE  TDECRNLNQCNGHGEVPGPPDYSCHCNPGYRSHQRYC  VDVNECEAEPCGPRGICMNTGGSYNCHCNRYRLHVGA  GGRSCVDLNECAKPHLCGDDGFCINFPGHYKCNCPGYRL  KASRPPVEDIDECDPSSCPDGKCNKPGSFKCIACQPGY  RSQGGGACRDVNECAEGSPGWCENLPGSFRCTCAQGY  APAPDGRSCLDVDECEAGDVCNNGICSNTPGSFQCCLSG  YHLSRDRSHCEDIDECDFAACIGGDCINTNGSYRCLCPQG  HRLVGGKCKQDIDECSQDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCD  EGFTPTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFD DTVFCDSVLAT  NVTQEQCCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGK  GYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECLMFGSEICKEGKCVNTQPG  YECYCKQGFYDGNLLECVDVDECLDESNCRNGVCENTR  GGYRCACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVDECQDPAACRPG  RCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERD  VCWSQRGEDGMCAGPLAGPALTFDCCCRQGRGWGAQC  RPCPPRGAGSHCPTSQSESNSFWDTSPLLL GKPPREDSSEE  DSECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDID  ECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRVCVCKAGFARSRPHGA  CVPQRRR</p>	157

In alcuni casi, le LTBP possono comprendere marcatori rivelabili. Marcatori rivelabili possono essere usati per consentire la rivelazione e/o l'isolamento di proteine ricombinanti comprendenti le LTBP. Alcuni marcatori

rivelabili possono comprendere marcatori biotina, poliiistidina tag e/o flag tag. Tali tag possono essere usati per isolare le proteine taggate. Le proteine prodotte possono comprendere amminoacidi aggiuntivi codificanti per uno o più siti di clivaggio per proteasi 3C. Tali siti consentono il clivaggio in corrispondenza del sito di clivaggio per proteasi 3C su trattamento con proteasi 3C, includente, ma non limitata a proteasi 3C di rhinovirus. Tali siti di clivaggio possono essere introdotti per consentire la rimozione dei marcatori rivelabili dalle proteine ricombinanti. In alcuni casi, GARP, includenti, ma non limitate a forme ricombinanti di GARP, possono essere complessate con GPC ricombinanti. Alcuni GPC ricombinanti della presente descrizione possono essere co-espressi con le GARP per garantire ripiegamento e/o espressione corretti. In altri casi, l'omologo di GARP, contenente ripetizioni ricche in leucina 33 (LRRC33,) o frammenti e/o mutanti dello stesso può essere sostituito a GARP [anche riferito nella presente come contenente ripetizioni ricche in leucina 32 (LRRC32)] Tali frammenti e/o mutanti di LRRC33 possono comprendere una o più regioni dalla sequenza di LRRC33 elencate nella Tabella 10 qui sotto. GARP ricombinanti possono anche comprendere mutanti e/o frammenti di GARP. Alcuni GARP ricombinanti possono essere solubili (riferiti nella presente come sGARP).

In alcuni casi, GARP ricombinanti possono comprendere una o più sequenze amminoacidiche elencate nella Tabella 10. Alcune GARP ricombinanti usate nella presente possono essere espresse senza i residui N-terminali AQ. Le GARP espresse possono comprendere marcatori rivelabili. Tali marcatori rivelabili possono essere usati per consentire la rivelazione e/o l'isolamento. Alcuni marcatori rivelabili possono comprendere marcatori biotina, poliiistidina tag e/o flag tag. Tali tag possono essere usati per isolare le proteine taggate. Le proteine prodotte possono comprendere amminoacidi aggiuntivi codificanti per uno o più siti di clivaggio per proteasi 3C. Tali siti consentono il clivaggio in corrispondenza del sito di clivaggio per proteasi 3C su trattamento con proteasi 3C, includente, ma non limitata a proteasi 3C di rhinovirus. Siti di clivaggio per proteasi 3C possono essere introdotti per consentire la rimozione dei marcatori rivelabili dalle proteine ricombinanti.

Tabella 10. Sequenze di GARP

Proteina	Sequenza	SEQ ID NO
GARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPDTEITDLS GNQLRSILASPLGFYALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHL EHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSDGNSLYSG LLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDL HSNVLMIEDGAFEGPLRLTHLNLNLSRNSLTCISDFSLQQLRV LDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAA LPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPS GNASGRPLSQLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRN CLRTFEARRLGLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRT LLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEP GPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFHTPLTELDLS SNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFI CLKRLNLAENRSLHLPWTQAVSLEVLDLRNNSFSLPGSA MGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAACLHQGRVDVDA TQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGGLKNINLIILFILVS AILLTTLAACCCVRRQKFNQYKA	158
sGARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPDTEITDLS GNQLRSILASPLGFYALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHL EHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSDGNSLYSG LLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDL HSNVLMIEDGAFEGPLRLTHLNLNLSRNSLTCISDFSLQQLRV LDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAA LPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPS GNASGRPLSQLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRN CLRTFEARRLGLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRT LLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEP GPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFHTPLTELDLS SNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFI CLKRLNLAENRSLHLPWTQAVSLEVLDLRNNSFSLPGSA MGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAACLHQGRVDVDA TQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGGLKNIN	159

LRRRC33	WRNRSGTATAASQGVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPH ARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRG AFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRDL SGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEG LERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNLP PCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETDL SHNQLLFFPLLPQYSKLRLLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVA QFLLVVDGNVTNITTVSLWEEFSSDLADLRFLDMSQNFQY LPDGFRLKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDL SHNQLSELHLAPGLASCLGSLRFLNLSNQLLGVPPGLFAN ARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLR SLSLEGCGLGALPDCPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGLAPL QDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALDFSGFGNLRDLDSG NCLTTFRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGL RTIYLSQNPYDCCGVVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSS KIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGLLYLVILPSCLTLLVAC TVIVLTFKKPLLQVIKSRCHWSSVY	160
sLRRRC33	WRNRSGTATAASQGVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPH ARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRG AFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRDL SGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEG LERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNLP PCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETDL SHNQLLFFPLLPQYSKLRLLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVA QFLLVVDGNVTNITTVSLWEEFSSDLADLRFLDMSQNFQY LPDGFRLKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDL SHNQLSELHLAPGLASCLGSLRFLNLSNQLLGVPPGLFAN ARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLR SLSLEGCGLGALPDCPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGLAPL QDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALDFSGFGNLRDLDSG NCLTTFRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGL RTIYLSQNPYDCCGVVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSS KIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGL	161

I GPC legati alle LTBP possono adottare conformazioni tridimensionali che sono distinte dalle conformazioni trovate con i GPC legati a GARP o a altre proteine della matrice. Ciò può essere dovuto, in alcuni casi, alla presenza su LTBP di cisteine disponibili per la formazione di legami disolfuro con i GPC che comprendono una distanza l'una dall'altra diversa rispetto alle corrispondenti cisteine disponibili per la formazione di legami disolfuro su GARP. Tali differenze nelle conformazioni tridimensionali possono fornire epitopi dipendenti dalla conformazione unici sui GPC. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi dell'invenzione sono diretti verso tali epitopi dipendenti dalla conformazione. Tali anticorpi possono funzionare selettivamente per attivare o inibire l'attività del fattore di crescita a seconda dell'identità della proteina legata (ad es. LTBP o GARP). In alcuni casi,

differenti epitopi dipendenti dalla conformazione possono essere presenti sulle alfa eliche N-terminali di proTGF- $\beta$  quando legato a LTBP o a GARP.

Alcune proteine ricombinanti possono essere co-espresse con perlecano. Tali proteine ricombinanti possono includere, ma non sono limitate a GDF-8. Studi da parte di Sengle et al (Sengle et al., 2011. J Biol Chem. 286(7):5087-99) hanno scoperto che il prodominio da GDF-8 si associa con perlecano. Ulteriori studi indicano che il knockout per perlecano porta all'ipertrofia muscolare, suggerendo che l'interazione tra GDF-8 e perlecano può contribuire all'attività di GDF-8 (Xu et al. 2010. Matrix Biol. 29(6):461-70.)

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della descrizione possono essere co-espresse con follistatina e/o FLRG. Tali proteine ricombinanti possono includere, ma non sono limitate a GDF-8. È noto che sia follistatina sia FLRG antagonizzano alcune proteine membri della famiglia del TGF- $\beta$ , includenti, ma non limitate a GDF-8 (Lee, S-J. et al., 2010. Mol Endocrinol. 24(10): 1998-2008, Takehara-Kasamatsu, Y. et al., 2007. J Med Invest. 54(3-4):276-88.) È stato mostrato che la follistatina blocca l'attività di GDF-8 legandosi al fattore di crescita libero e impedendo il legame al recettore. Sia follistatina sia FLRG sono implicate nella modulazione dell'attività del fattore di crescita durante lo sviluppo.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della descrizione possono essere co-espresse con decorina. Tali proteine ricombinanti possono includere, ma non sono limitate a TGF- $\beta$  e GDF-8. La decorina è un noto antagonista dell'attività di TGF- $\beta$  (Zhu, J. et al., 2007. J Biol Chem. 282:25852-63) e può anche antagonizzare altri membri della famiglia del TGF- $\beta$ , includenti, ma non limitati a GDF-8. È stato mostrato che l'inibizione dipendente da decorina dell'attività di TGF- $\beta$  e GDF-8 riduce la fibrosi in vari tessuti. È stato anche mostrato che l'espressione della decorina aumenta l'espressione di follistatina, un noto inibitore di GDF-8 libero.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere quelle rappresentate nella Figura 7. Alcune proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere una o più caratteristiche e/o combinazioni di moduli proteici dai casi rappresentati nella Figura 7.

#### *Attivine e inibine ricombinanti*

Le attivine e le inibine sono proteine membri della famiglia del TGF- $\beta$ , l'attività di ognuna delle quali spesso si

traduce in funzioni opposte (Bilezikjian et al 2012). Come altri membri della famiglia, queste proteine si presentano fisiologicamente come dimeri. Attivine e inibine sono costruite in parte dalle stesse subunità  $\beta$ , che possono includere inibina-beta A, inibina-beta B, inibina-beta C e inibina-beta E (riferite nella presente come subunità  $\beta$  A, B, C ed E, rispettivamente). La differenza tra attivine e inibine, strutturalmente, è che le attivine sono dimeri di subunità  $\beta$  mentre le inibine sono eterodimeri, in cui la seconda subunità è inibina- $\alpha$ . Le attivine prendono il nome dalle loro coppie di subunità, cosicché attivina A comprende un omodimero di due subunità A, attivina AB comprende un dimero di subunità A e B, B comprende un dimero di subunità B, etc. (Muenster et al 2011). Le attivine sono implicate in una varietà di funzioni che possono includere, ma non sono limitate a crescita cellulare, differenziazione, morte cellulare programmata, funzioni endocrine, metabolismo cellulare, crescita ossea, etc. Sono in particolare riconosciute per il loro controllo dei cicli degli ormoni della riproduzione. La segnalazione delle attivine e delle inibine a questo proposito spesso funziona antagonisticamente.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere le integrine. Le integrine sono eterodimeri di superficie cellulare formati da subunità alfa e beta, ognuna delle quali ha un dominio transmembrana e nella porzione N-terminale del dominio extracellulare si uniscono a formare il sito di legame per il ligando. Le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere integrine e/o subunità di integrine. Tali integrine e/o subunità di integrine possono comprendere qualunque di quelle descritte nella Domanda di Brevetto Provvisoria degli Stati Uniti Numero 61/722,919 depositata il 6 Novembre 2012.

Proteine ricombinanti dell'invenzione possono includere molecola di adesione intercellulare 1 (ICAM-1). In alcuni casi, le proteine ICAM-1 della presente descrizione possono essere usate come proteine di controllo durante lo sviluppo degli anticorpi e/o i test degli anticorpi. In alcuni casi, ICAM-1 può essere usata come controllo durante la selezione di molecole leganti utilizzando tecnologie di esposizione su fago. In alcuni casi, le proteine ICAM-1 dell'invenzione comprendono uno o più marcatori rivelabili. I marcatori rivelabili possono includere, ad esempio, i tag istidinici.

#### *Proteine chimeriche*

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere proteine chimeriche. Come

usato nella presente, il termine "proteina chimerica" si riferisce a una proteina comprendente uno o più moduli proteici da almeno due proteine differenti [formate dallo stesso gene (ad esempio varianti derivanti da splicing alternativo) o da geni differenti]. Le proteine chimeriche possono comprendere moduli proteici da due o più proteine membri della famiglia del TGF- $\beta$ . Tali proteine chimeriche possono comprendere moduli proteici da TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e/o TGF- $\beta$ 3. Alcune proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere moduli proteici includenti, ma non limitati ai moduli proteici e/o alle sequenze amminoacidiche elencate nella Tabella 12 (i numeri di residuo corrispondono alle sequenze di pro-proteina elencate nella Tabella 1). Alcune proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere moduli proteici comprendenti sequenze amminoacidiche simili a quelle nella Tabella 12, ma comprendenti amminoacidi in più o in meno rispetto a quelli elencati. Tali moduli possono comprendere circa 1 amminoacido in più o in meno, circa 2 amminoacidi in più o in meno, circa 3 amminoacidi in più o in meno, circa 4 amminoacidi in più o in meno, circa 5 amminoacidi in più o in meno, circa 6 amminoacidi in più o in meno, circa 7 amminoacidi in più o in meno, circa 8 amminoacidi in più o in meno, circa 9 amminoacidi in più o in meno, circa 10 amminoacidi in più o in meno o più di 10 amminoacidi in più o in meno sulle estremità N-terminali e/o C-terminali.

**Tabella 12. Moduli proteici**

<b>Proteina</b>	<b>Residui</b>	<b>Sequenza</b>	<b>SEQ ID NO</b>
TGF- $\beta$ 1	1-74	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADY	171
TGF- $\beta$ 1	1-207	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSDSRDNTLQVDI	172

TGF-β1	46 - estremità	EAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTR VLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEP VLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSNNSWRYS NRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLS AHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRP LLLMTPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCC VRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIW SLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIV YYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	173
TGF-β1	47- estremità	AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRV LMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVL LSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSNNSWRYSN LLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAH CSCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFL LMTPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVR QLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSL DTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYY VGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	174
TGF-β1	74 - 249	YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSE LREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSN NSWRYSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGG EIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR	175
TGF-β1	74 - estremità	YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSE LREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSN NSWRYSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGG EIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCF SSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVP QALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	176
TGF-β1	75-249	YAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSEL REAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSN SWRYSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEI EGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIH GMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR	177

TGF-β1	75- estremità	YAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSEL REAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVLYQKYSNN SWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVROWLSRGGEI EGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIH GMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSS TEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLG PCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQA LEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	178
TGF-β1	228-361	FLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSSTEKNC CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI WSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPI VYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	179
TGF-β1	250-361	ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGA SAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSC KCS	44
TGF-β2	232 - 260	FAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSTGKTP	65
TGF-β2	236 - 254	GTSTYTSGDQKTIKSTRKK	180
TGF-β3	1 - 46	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEP TVMTHVP	43
TGF-β3	1 - 79	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEP TVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQEN TESE	181
TGF-β3	80-280	YYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNV SSVEKNRTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQIL RPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRDLGRLKKQKDHHPHLILMMIPP HRLDNPQGGQRRKR	182
TGF-β3	281-392	ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEP KGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEAS ASPCCVPQDLEPLTILYVGRTPKVEQLSNMIVVKSCK CS	46
GDF-8	1-75	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQL SKLRLLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQR	183

GDF-8	1-64	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQIL SKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPL	72
GDF-8	75 - estremità	RDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGK PKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFV QILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVK TVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGE DGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCR YPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQK YPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGK EQIYGKIPAMVVDRCGCS	184
GDF8	65- estremità	RELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTES DFLMQVDGPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLR PVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPG TGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHD LAVTFPGGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCD EHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCS GECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSP INMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRCGCS	185
GDF8	65-243	RELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTES DFLMQVDGPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLR PVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPG TGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHD LAVTFPGGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRR	77
GDF-8	76-243	DDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGK KCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQI LRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVK TVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGE DGLNPFLEVKVTDTPKRSRR	186
GDF-8	244-352	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKR YKANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPC CTPTKMSPINMLYFNGKEQIYGKIPAMVVDRCGCS	74
GDF-11	1-86	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPPAPVAPEPD GCPVCVWRQHSRELRLRESIKSQILSKLRLKEAPNISRE VVKQLLPKAPPL	73
GDF-11	1-96	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPPAPVAPEPD GCPVCVWRQHSRELRLRESIKSQILSKLRLKEAPNISRE VVKQLLPKAPPLQQLDLHDFQ	187

GDF-11	1-108	AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPPAPSVAPEPD GCPVCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEAPNISRE VVKQLLPKAPPLQQILDLHDFQGDALQPEDFLEE	188
GDF-11	97-274	GDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDPAVQTDG SPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAWVYLRPVPRPATV YLQILRLKPLTGEGTAGGGGGRRHIRIRSLKIELHSR SGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSNWGIEINAFDPSGTD LAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKRSRR	189
GDF-11	87-274	QQILDLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQ ETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAWVY LRPVPRPATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGRRHIRI RSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSNWGIEI NAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKRS RR	78
GDF-11	275-383	NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIAPKR YKANYCSGQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGP CCTPTKMSPINMLYFNDKQIIYGKIPGMVVDRCGCS	75
Inibina Beta A	1-64	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEA VKKHILNMLHLKKRPDVTQVPVKAALL	190
Inibina Beta A	1-76	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEA VKKHILNMLHLKKRPDVTQVPVKAALLNAIRKLHVG KVG	191
Inibina Beta A	65-288	NAIRKLHVGKVGGENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQT SEITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFL KVPKANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGLDTGEEAEVVG LKGERSELLLSEKVVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQ GKSSLDVRIACEQCOESGASLVLLGKKKKKKEEGEGK KKGGEAGAGADEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPPH RR	192
Inibina Beta A	65-289	NAIRKLHVGKVGGENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQT SEITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFL KVPKANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGLDTGEEAEVVG LKGERSELLLSEKVVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQ GKSSLDVRIACEQCOESGASLVLLGKKKKKKEEGEGK KKGGEAGAGADEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPPH RRR	193

Inibina Beta A	65-290	NAIRKLHVGKVGGENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQT SEITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWFL KVPKANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEEV LKGERSSELLSEKVVVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQ GKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLGKKKKKEEGEGK KGGGGEGGAGADEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPR RRRR	194
Inibina Beta A	77-289	ENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEITFAESGTARK TLHFEISKEGSDLSVVERAEVWFLKVPKANRTRTKV TIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEEVGLKGERSELLSEK VVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQKSSLDVRIACEQ CQESGASLVLLGKKKKKEEGEGKGGGGEGGAGA DEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPHRRRR	195
Inibina Beta A	77-290	ENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEITFAESGTARK TLHFEISKEGSDLSVVERAEVWFLKVPKANRTRTKV TIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEEVGLKGERSELLSEK VVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQKSSLDVRIACEQ CQESGASLVLLGKKKKKEEGEGKGGGGEGGAGA DEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPHRRRRR	196
Inibina Beta A	77- estremità	ENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEITFAESGTARK TLHFEISKEGSDLSVVERAEVWFLKVPKANRTRTKV TIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEEVGLKGERSELLSEK VVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQKSSLDVRIACEQ CQESGASLVLLGKKKKKEEGEGKGGGGEGGAGA DEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPHRRRRRGLCDGK VNICCKKQFFVSFKDIGWNDWIIAPSGYHANYCEGEC PSHIAGTSGSSLSFHSTVINHYRMRGHSPFANLKSCCV PTKLRPMSMLYDDGQNIKKDIQNMIVEECGS	197
Inibina Beta A	291-406	GLECDGKVNICCKKQFFVSFKDIGWNDWIIAPSGYHA NYCEGECPSHIAGTSGSSLSFHSTVINHYRMRGHSPFA NLKSCCVPTKLRPMSMLYDDGQNIKKDIQNMIVEE CGCS	198

In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere combinazioni di qualunque dei moduli proteici elencati nella Tabella 12. Alcune proteine chimeriche comprendenti GPC possono comprendere moduli proteici che sono stati sostituiti con qualunque dei moduli proteici elencati nella Tabella 12. In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere combinazioni di moduli proteici includenti, ma non limitati alle combinazioni di moduli proteici e/o sequenze amminoacidiche elencati

nella Tabella 13. Alcune proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere moduli proteici comprendenti sequenze amminoacidiche simili a quelle nella Tabella 13, ma comprendenti amminoacidi in più o in meno rispetto a quelli elencati. Tali sequenze amminoacidiche possono comprendere circa 1 amminoacido in più o in meno, circa 2 amminoacidi in più o in meno, circa 3 amminoacidi in più o in meno, circa 4 amminoacidi in più o in meno, circa 5 amminoacidi in più o in meno, circa 6 amminoacidi in più o in meno, circa 7 amminoacidi in più o in meno, circa 8 amminoacidi in più o in meno, circa 9 amminoacidi in più o in meno, circa 10 amminoacidi in più o in meno o più di 10 amminoacidi in più o in meno sulle estremità N-terminali e/o C-terminali.

**Tabella 13. Combinazioni di moduli proteici**

<b>Modulo proteico 1</b>	<b>Modulo proteico 2</b>	<b>Modulo proteico 3</b>	<b>Sequenza Chimerica</b>	<b>SEQ ID NO</b>
TGF- $\beta$ 2 LAP	TGF- $\beta$ 1 fattore di crescita	N/A	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRQLQNPVKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHEWLHKKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSQDQKTIKSTRKKNKSGKTPHLLMLLPSYRLESQQTNRKKRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	199
TGF- $\beta$ 3 LAP	TGF- $\beta$ 1 fattore di crescita	N/A	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGGQRKKRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	200

TGF-β3 (1-46)	TGF-β1 (47- estremità)	N/A	ELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTG VVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDI NGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQH LQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRK DLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYS KVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYV G RKPKVEQLSNMIVRSCKCS SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSP PEPTVMTHVPAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEP EADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYM FFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHV	201
TGF-β3 (1-79)	TGF-β1 (75- estremità)	N/A	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSP PEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEG CTQENTESEYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLV VEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLS FDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNT LQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLY IDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSL DTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIV YYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	202
TGF-β1 (1-74)	TGF-β3 (80-280)	TGF-β1 (250- 361)	LSTCKTIDMELVKKRRIE AIRGQILSKLRLASPPSQ GEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPE ADYYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSK VFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNE QRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPN GDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKK QKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGGQQRKKRAL DTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHN P GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNM IVRSCKCS	203
TGF-β3 (1-79)	TGF-β1 (75-249)	TGF-β3 (281- 392)	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSP PEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEG CTQENTESEYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLV VEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLS FDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNT LQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRRALDTNYCFRNLEENCCVRPLY IDFRQDLGKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRS ADTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTIL YYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	204

TGF- $\beta$ 1 (1-207)	TGF- $\beta$ 2 loop di innesco Breve (236 - 254)	TGF- $\beta$ 1 (228- 361)	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQ GEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPE ADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMF FNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVKVEQHVE LYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGV VRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDIG TSTYTSQDQKTIKSTRKKFLLMATPLERAQHLQS SRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLG WKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKP KVEQLSNMIVRSCKCS	205
TGF- $\beta$ 1 (1-207)	TGF- $\beta$ 2 loop di innesco Lungo (232 - 260)	TGF- $\beta$ 1 (228- 361)	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQ GEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPE ADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMF FNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVKVEQHVE LYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGV VRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDIA GIDGTSTYTSQDQKTIKSTRKNSGKTPFLLMAT PLERAQHLQSSRHRALDTNYCFSSTEKNCCVRQ LYIDFRKDLGKWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWS LDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLP IVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	206
GDF-11 (1-96)	GDF-8 (76-243)	GDF-11 (275- 383)	AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVAP EPDGPCVWVRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEA PNISREVVKQLLPKAPPLQILDLDHDFQDDSSDGS LEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGPKKCCF KFSSKIYQNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILR LIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKT VLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAFTFPGP GEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRNLGLDCDEHSSE SRCCRYPLTVDFEAFGWWDWIIAPKRYKANYCSGQ CEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKM SPINMLYFNDKQIYKIPGMVVDRCGCS	207
GDF-11 (1-86)	GDF-8 (65-243)	GDF-11 (275- 383)	AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVAP EPDGPCVWVRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEA PNISREVVKQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDG SLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGPKKCCF FKFSSKIYQNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQIL RLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDV KTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAFTFP GPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRNLGLDCDEHS SESRCRYPLTVDFEAFGWWDWIIAPKRYKANYCS GQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPT KMSPINMLYFNDKQIYKIPGMVVDRCGCS	208

GDF-11 (1-96)	GDF-8 (76-243)	N/A	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVAP EPDGCPCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEA PNISREVVKQLLPKAPPLQQILDLHDFQDDSSDGS LEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFF KFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILR LIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKT VLQNLWKQPESNLGIEIKALDENGHDLAFTFPGP GEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRR	209
GDF-11 (1-86)	GDF-8 (65-243)	NA	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVAP EPDGCPCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEA PNISREVVKQLLPKAPPLRELIDQYDVRDDSSDG SLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFF FKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQIL RLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDV KTVLQNLWKQPESNLGIEIKALDENGHDLAFTFP GPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRR	210
GDF-11 (1-96)	Inibina Beta A (77-290)	GDF-11 (275- 383)	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVAP EPDGCPCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEA PNISREVVKQLLPKAPPLQQILDLHDFQENGYVEI EDDIGRRAEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHF EISKEGSDLSVVERAEVWFLKVPKANRTRTKVTI RLFQQQKHPQGS�DTGEEAEVGLKGERSELLS EKVVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRI ACEQCQESGASVLLGKKKKKEEGEGKGGGG EGGAGADEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPPHRR RRNLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWI IAPKRYKANYCSGQCEYMFQMKYPHTHLVQQAN PRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQIHYGKIPG MVVDRCGCS	211
GDF-11 (1-86)	Inibina Beta A (65-290)	GDF-11 (275- 383)	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVAP EPDGCPCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEA PNISREVVKQLLPKAPPLNAIRKLHVGVGENGY VEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTL HFEISKEGSDLSVVERAEVWFLKVPKANRTRTK VTIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEVGLKGERSELL LSEKVV DARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLD VRIACEQCQESGASVLLGKKKKKEEGEGKGGGG GGEGGAGADEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPPH RRRRNLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWD WIIAPKRYKANYCSGQCEYMFQMKYPHTHLVQQ ANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQIHYGKI PGMVVDRCGCS	212

GDF-11 (1-96)	Inibina Beta A (77-290)	N/A	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSSRPAPSVAP EPDGPVCVWRQHSRELRLSEIKSQLSKLRLKEA PNISREVVKQLLPKAPPLQQILDLHDFQENGYVEI EDDIGRRAEMNELMEQTSEITFAESGTARKTLHF EISKEGSDLSVVERAEVWFLKVPKANRTRTKVTI RLFQQQKHPQGS�DTGEEAEEVGLKGERSELLS EKVVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRI ACEQCQESGASLVLLGKKKKKEEEGEGKKGKGG EGGAGADEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPHRRR RR	213
GDF-11 (1-86)	Inibina Beta A (65-290)	NA	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSSRPAPSVAP EPDGPVCVWRQHSRELRLSEIKSQLSKLRLKEA PNISREVVKQLLPKAPPLNAIRKLHVGVGENGY VEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEITFAESGTARKTL HFEISKEGSDLSVVERAEVWFLKVPKANRTRTK VTIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEEVGLKGERSELL LSEKVVVDARKSTWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLD VRIACEQCQESGASLVLLGKKKKKEEEGEGKKGKGG GGEGGAGADEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPR RRRR	214
GDF-8 (1-75)	GDF-11 (97-274)	GDF-8 (244- 352)	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKI QILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQY DVQRGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETD PAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLWVY LRPVPRPATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGRR HIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQS NWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELR VLENTKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFE AFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTH LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQII YGKIPAMVVDRCGCS	215
GDF-8 (1-64)	GDF-11 (87-274)	GDF-8 (244- 352)	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKI QILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLQQILDLH DFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDP AVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLWVYL RPVPRPATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGRRHI RIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSN WGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRV LENTKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEA FGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHL VHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIY GKIPAMVVDRCGCS	216

GDF-8 (1-75)	GDF-11 (97-274)	N/A	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKI QILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQY DVQRGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETD PAVQTDGSPLCCHFHFSKVMFTKVLKAQLWVY LRPVPRPATVYVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGRR HIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQS NWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELR VLENTKRSRR	217
GDF-8 (1-64)	GDF-11 (87-274)	GDF-8 (244- 352)	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKI QILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLQIILDLH DFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDP AVQTDGSPLCCHFHFSKVMFTKVLKAQLWVYL RPVPRPATVYVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGRRHI RIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSN WGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRV LENTKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEA FGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHL VHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIY GKIPAMVVDRCGCS	218
GDF-8 (1-75)	Inibina Beta A (77-289)	GDF-8 (244- 352)	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKI QILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQY DVQRENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEITFA ESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWFLKVP KANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEEVG LKGERSSELLSEKVV DARKSTWHVFPVSSSIQRL DQKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLGKKKKKEE EGEGKKKGGGEGGAGADEEKEQSHRPFLMLQAR QSEDHPHRRRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTV FEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPH THLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKE QIIYGKIPAMVVDRCGCS	219
GDF-8 (1-64)	Inibina Beta A (65-290)	GDF-8 (244- 352)	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKI QILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLNAIRKLH VGKVGENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEITF AESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWFLK VPKANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEE VGLKGERSSELLSEKVV DARKSTWHVFPVSSSIQ LLDQKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLGKKKKK EEEGEGKKKGGGEGGAGADEEKEQSHRPFLMLQ ARQSEDHPHRRRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPL TVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQK YPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFN GKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	220

GDF-8 (1-75)	Inibina Beta A (77-290)	N/A	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKI QILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQY DVQRENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEITFA ESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWFLKVP KANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEEVG LKGERSSELLSEKVV DARKSTWHVFPVSSSIQRLL DQKSSLDVRIACEQCQESGASL VLLGKKKKKEE EGEGKKKGGGEGGAGADEEKEQSHRPFLMLQAR QSEDPHRRRRR	221
GDF-8 (1-64)	Inibina Beta A (65-290)	NA	NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKI QILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLNAIRKLLH VGKVGGENGYVEIEDDIGRRAEMNELMEQTSEITFA AESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWFLK VPKANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGS�DTGEEAEE VGLKGERSELLSEKVV DARKSTWHVFPVSSSIQR LLDQKSSLDVRIACEQCQESGASL VLLGKKKKK EEEGEGKKKGGGEGGAGADEEKEQSHRPFLMLQ ARQSEDPHRRRRR	222
Inibina Beta A (1-76)	GDF-8 (76-243)	Inibina Beta A (291- 406)	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQP EMVEAVKKHILNMLHLKRPDVTQVPKAALLNAIR KLHVGVGDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMP TESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIYQNKVVKA QLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRY TGIRSLKLD MNPGTGIWQSIDVKT VLNWLK QPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGL NPFLEVKVTDTPKR SRRGLECDGKVNICKK QFFVSFKDIGWNDWIIAP SGYHANYCEGEC PSHIAGTSGSSLSFHSTVINHYR MRGHSP FANLKSCCVPTKLRPMSMLYDDGQNI KKDIQNMIVEECGCS	223
Inibina Beta A (1-64)	GDF-8 (65-243)	Inibina Beta A (291- 406)	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQP EMVEAVKKHILNMLHLKRPDVTQVPKAALLRE LIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMP TESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIYQNKVVKA QLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRY TGIRSLKLD MNPGTGIWQSIDVKT VLNWLK QPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGGEDGL NPFLEVKVTDTPKR SRRGLECDGKVNICKK QFFVSFKDIGWNDWIIAP SGYHANYCEGEC PSHIAGTSGSSLSFHSTVINHYR MRGHSP FANLKSCCVPTKLRPMSMLYDDGQNI KKDIQNMIVEECGCS	224

Inibina Beta A (1-76)	GDF-8 (76-243)	N/A	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQP EMVEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQVPK AALLNAIRKLHVGVGGDDSSDGSLEDD DYHATTETIITMPESDFLMQVDGKPK CCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLR PVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYT GIRSLKLD MNPGTGIWQSIDVKT VLQNW LKQPESNLGIEIKALDENG HDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKV TDTPKRSRR	225
Inibina Beta A (1-64)	GDF-8 (65-243)	NA	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQP EMVEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQVPK AALLRELI DQYDVQRDSSDGSLEDD DYHATTETIITMPESDFLMQVDGKPK CCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLR PVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYT GIRSLKLD MNPGTGIWQSIDVKT VLQNW LKQPESNLGIEIKALDENG HDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKV TDTPKRSRR	226
Inibina Beta A (1-76)	GDF-11 (97-274)	Inibina Beta A (291-406)	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQP EMVEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQVPK AALLNAIRKLHVGVGGDALQPEDFLE EDEYHATTETVISMASETDP AVQTDGSP LCCHFHFS PKVMFTK VLKAQLWVYLRPVPRPATVYLQIL RLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIRIR SLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLH SWFRQPQSNW GIEINAFDPSG TDLAVTSLGPGA EGLHFMELR VLENTKRSRRGLECDGKVNICCK KQFFVSFKDIGWNDWIIAPSGY HANYCEGECPSHIAGTSGSSLS FHSTVINHYRMRGHSPFANLKS CCVPTKLRPMSMLYYDDGQNI IKKDIQNMIVEECGCS	227
Inibina Beta A (1-64)	GDF-11 (87-274)	Inibina Beta A (291-406)	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQP EMVEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQVPK AALLQQILDLHDFQGDALQPEDFLE EDEYHATTETVISMAQETDPA VQTDGSP LCCHFHFS PKVMFTK VLKAQLWVYLRPVPRPATVYLQIL RLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIRIR SLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLH SWFRQPQSNW GIEINAFDPSG TDLAVTSLGPGA EGLHFMELR VLENTKRSRRGLECDGKVNICCK KQFFVSFKDIGWNDWIIAPSGY HANYCEGECPSHIAGTSGSSL SFHSTVINHYRMRGHSPFANLKS CCVPTKLRPMSMLYYDDGQNI IKKDIQNMIVEECGCS	228

Inibina Beta A (1-76)	GDF-11 (97-274)	N/A	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEM VEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQVPKAAALLNAIR KLHVGKVGGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMA QETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQL WVYLRPVP RPATVYQLRLKPLTGEGTAGGGGG GRRHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFR QPQSNWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPF MELRVLENTKRSRR	229
Inibina Beta A (1-64)	GDF-11 (87-274)	NA	SPTPGSEGHSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEM VEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQVPKAAALLQQL DLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQE TDP AVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLW VYLRPVP RPATVYQLRLKPLTGEGTAGGGGGG RRHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQ PQSNWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFM ELRVLENTKRSRR	230

Le proteine chimeriche possono essere usate per caratterizzare e/o mappare epitopi associati con i GPC. Come usato nella presente, i termini "mappare" o "mappatura" si riferiscono all'identificazione, alla caratterizzazione e/o alla determinazione di una o più regioni funzionali di una o più proteine. Tali caratterizzazioni possono essere necessarie per determinare le interazioni tra uno o più moduli proteici e un altro agente (ad es. un'altra proteina e/o un modulo proteico). Alcune proteine chimeriche possono essere usate per caratterizzare funzioni associate con una o più proteine e/o moduli proteici.

In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere le sequenze elencate nella Tabella 14 o frammenti delle stesse.

**Tabella 14. Proteine chimeriche**

Proteina	Sequenza	SEQ ID NO
proTGF- $\beta$ 1braccio3 C4S	LSTSKTIDMELVKKRRIEAI RQILSKLRLASPPSQGEVP PGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKE IHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSEKN RTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIA KQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNED DHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQ GQRKKRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQH NPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV RSCKCS	231

proTGF- $\beta$ 1 Loop di Innesco (corto) $\beta$ 2 C4S	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVP PGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKE VTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVP EPVLLSRAELRLLRLKLVQHVLYQKYSNNSWRYL SNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLS AHCSCDSRDNTLQVDINGFTGTSTYTSGDQKTIKSTRK KHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCF SSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQA LEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	232
proTGF- $\beta$ 3braccio1 C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTE SEYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTS ELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVLYQKYSN NSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGE IEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFRNL EENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPC PYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPDLEPL TILYYVGRTPKVEQLSNMIVRSCKCS	233
TGF- $\beta$ 1 braccio3 C4S (LAP)	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVP PGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKE IHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSVEKN RTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIA KQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVNED DHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQ GQRKKR	234
TGF- $\beta$ 3 braccio1 C7S (LAP)	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTE SEYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTS ELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVLYQKYSN NSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGE IEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRR	235
TGF- $\beta$ 1 Loop di Innesco (corto) $\beta$ 2 C4S (LAP)	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVP PGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKE VTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVP EPVLLSRAELRLLRLKLVQHVLYQKYSNNSWRYL SNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLS AHCSCDSRDNTLQVDINGFTGTSTYTSGDQKTIKSTRK KHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRR	236

In alcuni casi, le proteine chimeriche possono comprendere uno o più moduli proteici da TGF- $\beta$ 2. Sebbene la struttura cristallina per il fattore di crescita TGF- $\beta$ 2 sia stata chiarita (Daopin, S. et al., Crystal structure of transforming growth factor- $\beta$ 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*. 1992. 257(5068):369-73.) i meccanismi di attivazione restano da essere compresi a pieno. L'attivazione può essere dipendente da una o più interazioni tra il loop di innesco di TGF- $\beta$ 2 e l'integrina  $\alpha$ 9 $\beta$ 1. Il loop di innesco di TGF- $\beta$ 2 può comprendere caratteristiche strutturali e/o funzionali simili associate con sequenze RGD. I loop di innesco di TGF- $\beta$ 2 possono legare integrine, includenti, ma non limitate alle integrine  $\alpha$ 9 $\beta$ 1.

Secondo la colorazione dei tessuti murini, la subunità di integrina  $\alpha$ 9 è ampiamente espressa nel muscolo scheletrico e cardiaco, nel muscolo liscio viscerale, negli epatociti, nell'epitelio delle vie respiratorie, nell'epitelio squamoso, nell'epitelio del plesso coroideo e anche sui neutrofili (Palmer, E.L. et al., Sequence and tissue distribution of the integrin  $\alpha$ 9 subunit, a novel partner of  $\beta$ 1 that is widely distributed in epithelia and muscle. *Journal of Cell Biology*. 1993. 123(5):1289-97.) L'espressione di  $\alpha$ 9 non viene rivelata prima di E12.5, suggerendo che non svolge un ruolo importante nella morfogenesi dei tessuti iniziale (Wang, A. et al., Expression of the integrin subunit  $\alpha$ 9 in the murine embryo. *Developmental Dynamics*. 1995. 204:421-31.) Le funzioni *in vivo* di  $\alpha$ 9 sono non chiare. I fenotipi osservati in topi knockout suggeriscono un ruolo nello sviluppo delle valvole linfatiche (Bazigou, E. et al., Integrin-  $\alpha$ 9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. *Dev Cell*. 2009 August. 17(2):175-86.) I partner di interazione dell'integrina  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 riportati includono VCAM-1, il terzo dominio FnIII su tenascina C, osteopontina, polydom/SVEP1, VEGF-A e NGF (Yokasaki, Y. et al., Identification of the ligand binding site for the integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 in the third fibronectin type III repeat of tenascin C. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998. 273(19):11423-8; Marcinkiewicz, C. et al., Inhibitory effects of MLDG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 with VCAM-1, tenascin-C, and osteopontin. *JBC*. 2000. 275(41):31930-7; Oommen, S. et al., Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1. *JBC*. 2011. 286(2): 1083-92; Sato-Nishiuchi, R. et al., Polydom/SVEP1 is a ligand for integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1. *JBC*. 2012. 287(30):25615-30; Staniszevska, I. et al., Integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 is a receptor for

nerve growth factor and other neurotrophins. *Journal of Cell Science*. 2007. 121(Pt 4):504-13; Yokosaki, Y. et al., The integrin  $\alpha_9\beta_1$  binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *JBC*. 1999. 274(51):36328-34.)

I siti di legame su proteine che interagiscono con  $\alpha_9\beta_1$  sono stati mappati utilizzando peptidi lineari. Questi siti includono siti di legame su tenascina C (AEIDGIEL; SEQ ID NO: 237), osteopontina (SVVYGLR; SEQ ID NO: 238), polydom/SVEP1 (EDDMMEVPY; SEQ ID NO: 239) e VEGF-A (EYP). Diversamente da  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$  non richiede un motivo di sequenza RGD canonico. Alcuni, ma non tutti i bersagli riportati hanno un motivo residuo acido/residuo idrofobo/prolina. Alcuni comprendono anche un residuo di tirosina.

Il loop di innesco di TGF- $\beta_1$  e di TGF- $\beta_3$  porta una sequenza RGD dove  $\alpha_v\beta_6$  e/o  $\alpha_v\beta_8$  si legano per permettere il rilascio del fattore di crescita. La regione loop di innesco di TGF- $\beta_2$  è diversa da quelle di TGF- $\beta_1$  e TGF- $\beta_3$ , comprendendo la sequenza FAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTP (SEQ ID NO: 65), senza un trimero RGD. Di questa regione, i residui AGIDGTST (SEQ ID NO: 240) si allineano con il peptide sul terzo dominio FnIII di tenascina-C che è stato mappato come un sito di legame a  $\alpha_9\beta_1$ . Inoltre, la tirosina seguente questa regione può svolgere un ruolo nel potenziale legame di  $\alpha_9\beta_1$ . Perciò, il legame di  $\alpha_9\beta_1$  a TGF- $\beta_2$  potrebbe essere fisiologicamente rilevante. In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere sequenze di loop di innesco comprendenti qualunque delle sequenze elencate nella Tabella 15.

**Tabella 15. Sequenze di loop di innesco**

Proteina fonte	Sequenza loop di innesco	SEQ ID NO
TGF- $\beta$ 2	FAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTP	65
TGF- $\beta$ 2	AGIDGTST	240
TGF- $\beta$ 2	GTSTYTSGDQKTIKSTRKK	180
TGF- $\beta$ 1	INGFTTGRRGDLATIHGMNRP	241
TGF- $\beta$ 1	SGRRGDLATI	242
TGF- $\beta$ 1	TGRRGDLATI	243
TGF- $\beta$ 3	FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHP	244
GDF-8	PGEDGLNP	245
GDF-11	PGA EGLHP	246
Inibina A	RPEATP	247
BMP-9	SHRKGCDTLDISVPPGSRNLP	248
BMP-2	RHVIRISRLHQDEHSWSQIRP	249
BMP-4	QHVRISRSLPQSGNWAQLRP	250
BMP-7	IGRHGPQNKQP	251
BMP-6	VGRDGPYDKQP	252
BMP-8	LGQRAPRSQQP	253
Lefty1	RFASQGAPAGLGEP	254
osteopontina	SVVYGLR	238
tenascina C	AEIDGIEL	237
polydom/SVEP1	EDDMMEVPY	239
VEGF-A	EYP	--

In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere uno o più loop di innesco di TGF- $\beta$ 2. Tali proteine chimeriche possono esibire l'attivazione (ad es. rilascio del fattore di crescita) regolata in un modo simile a quello di TGF- $\beta$ 2. Alcune proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere proteine correlate a TGF- $\beta$  in cui uno o più moduli proteici sono sostituiti con uno o più moduli proteici comprendenti uno o più loop di innesco di TGF- $\beta$ 2. Alcune proteine chimeriche comprendono proteine correlate a TGF- $\beta$  in cui uno o più moduli proteici comprendenti almeno una sequenza RGD sono sostituiti con uno o più moduli proteici comprendenti uno o più loop di innesco di TGF- $\beta$ 2. In altri casi, le proteine chimeriche possono comprendere proteine TGF- $\beta$ 1 e/o TGF- $\beta$ 3 in cui uno o più moduli proteici comprendenti almeno una sequenza RGD sono sostituiti con uno o più moduli proteici comprendenti uno o più loop di innesco di TGF- $\beta$ 2. Tali proteine chimeriche possono esibire attività di TGF- $\beta$ 1.

In alcuni casi, le proteine chimeriche della presente descrizione possono comprendere uno o più moduli proteici dalle BMP. Moduli proteici comprendenti sequenze dalle BMP possono comprendere sequenze da qualunque di quei moduli di BMP descritti nella Figura 8. Le proteine chimeriche della presente descrizione comprendenti uno

o più moduli proteici delle BMP possono essere utili per lo sviluppo di anticorpi e/o saggi per studiare, potenziare e/o perturbare interazioni delle BMP con altre proteine, includenti, ma non limitate alle proteine RGM.

Le proteine chimeriche possono comprendere marcatori rivelabili. I marcatori rivelabili possono essere usati per consentire la rivelazione e/o l'isolamento delle proteine chimeriche. Tali marcatori rivelabili possono comprendere marcatori biotina, poliistidina tag e/o flag tag. I tag possono essere usati per identificare e/o isolare le proteine taggate. Le proteine prodotte possono comprendere amminoacidi aggiuntivi codificanti per uno o più siti di clivaggio per proteasi 3C. Tali siti consentono il clivaggio in corrispondenza del sito di clivaggio per proteasi 3C su trattamento con proteasi 3C, includente, ma non limitata a proteasi 3C di rhinovirus. I siti di clivaggio per proteasi 3C possono essere introdotti per consentire la rimozione dei marcatori rivelabili dalle proteine chimeriche.

#### *Espressione proteica*

In alcuni casi, la sintesi delle proteine ricombinanti della presente descrizione può essere effettuata secondo qualsiasi metodo noto nella tecnica. Alcune sintesi proteiche possono essere effettuate *in vitro*. Alcune sintesi proteiche possono essere effettuate utilizzando le cellule. Tali cellule possono essere batteriche e/o eucariotiche. In alcuni casi, per la sintesi proteica possono essere usate cellule eucariotiche. Alcune tali cellule possono essere di mammifero. Alcune cellule di mammifero usate per l'espressione proteica possono includere, ma non sono limitate a cellule di topo, cellule di coniglio, cellule di ratto, cellule di scimmia, cellule di criceto e cellule umane. Tali cellule possono essere derivate da una linea cellulare. In altri casi, possono essere usate cellule umane. In ulteriori casi, le linee cellulari possono includere, ma non sono limitate a cellule HEK293, cellule CHO, cellule HeLa, cellule Sw-480, cellule di linfoma T EL4, cellule TMLC, cellule 293T/17, cellule Hs68, cellule CCD1112sk, cellule HFF-1, fibroblasti cheloidei, cellule A204, cellule L17 RIB e cellule C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

In alcuni casi, per la sintesi di proteine ricombinanti della presente descrizione vengono usate cellule 293. Queste cellule sono cellule umane che modificano post-traduzionalmente le proteine con strutture simili a quelle umane (ad es. i glicani). Tali cellule sono facilmente trasfettabili e scalabili e sono in grado di crescere ad alte densità in coltura in sospensione. Le cellule 293 possono includere cellule 293E. Le cellule 293E sono cellule HEK293 esprimenti stabilmente EBNA1 (antigene nucleare del virus Epstein-Barr-1). In alcuni casi, le cellule 293E

possono essere cresciute in terreno senza siero per semplificare la purificazione a valle. In alcuni casi, possono essere usate le cellule 293-6E (NRC Canada, Ottawa, CA). Tali cellule esprimono EBNA1 troncato (EBNA1t) e possono comprendere accresciuta produzione delle proteine ricombinanti e possono essere ottimizzate per la crescita e/o l'espressione proteica in terreno senza siero per semplificare la purificazione a valle. In alcuni casi, per esprimere le proteine ricombinanti della descrizione possono essere usate cellule di insetto. In alcuni casi, può essere effettuata espressione in cellule di insetto utilizzando cellule di *Spodoptera frugiperda* includenti, ma non limitate a cellule Sf9 e/o Sf-21. In alcuni casi, colture di cellule di insetto possono comprendere cellule di *Trichoplusia ni*, includenti, ma non limitate a cellule Tn-368 e/o HIGH-FIVE™ BTI-TN-5B1-4. Un ulteriore elenco di linee cellulari di insetto esemplari si possono trovare nel Brevetto US No. 5,024,947.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della descrizione possono comprendere un dominio Fc di anticorpo per creare una proteina di fusione all'Fc. La formazione di una proteina di fusione all'Fc con qualunque delle proteine ricombinanti descritte nella presente può essere effettuata secondo qualsiasi metodo noto nella tecnica, incluso come descritto in Czajkowsky, D.M. et al., 2012. EMBO Mol Med. 4(10):1015-28 e nei brevetti degli Stati Uniti No. 5,116,964, 5,541,087 e 8,637,637. Le proteine di fusione all'Fc possono essere legate alla regione cerniera di un Fc di IgG attraverso residui di cisteina nella regione cerniera dell'Fc. Le proteine di fusione all'Fc risultanti possono comprendere una struttura simile a quella degli anticorpi, ma senza domini C<sub>H1</sub> o catene leggere. In alcuni casi, le proteine di fusione all'Fc possono comprendere profili farmacocinetici paragonabili agli anticorpi nativi. In alcuni casi, le proteine di fusione all'Fc possono comprendere un'emivita in circolazione estesa e/o un'attività biologica modificata. In alcuni casi, le proteine di fusione all'Fc possono essere preparate utilizzando qualunque delle proteine della famiglia del TGF- $\beta$  o delle proteine correlate a TGF- $\beta$  descritte nella presente. In alcuni casi, le proteine di fusione all'Fc possono comprendere TGF- $\beta$ , GDF-8 e/o GDF-11.

Le sequenze codificanti per proteine ricombinanti della presente descrizione possono essere inserite in qualunque numero di vettori di DNA noti nella tecnica per l'espressione. Tali vettori possono includere i plasmidi. In alcuni casi, le sequenze codificanti per proteine ricombinanti della presente descrizione sono clonate in vettori pTT5 (NRC Biotechnology Research Institute, Montreal, Quebec.) In altri casi possono essere usati i vettori pTT22,

pTT28, pYD5, pYD7, pYD11(NRC Biotechnology Institute, Montreal, Quebec) e/o pMA (Life Technologies, Carlsbad, CA). I vettori possono comprendere sequenze promotori per modulare l'espressione di sequenze codificanti per le proteine ricombinanti della presente descrizione. Tali promotori possono essere costitutivamente attivi e/o possono essere regolati da fattori estrinseci e/o intrinseci. Alcuni fattori estrinseci possono essere usati per accrescere o sopprimere l'espressione di sequenze codificanti per le proteine ricombinanti della presente descrizione. Alcuni vettori possono codificare segnali di localizzazione nucleare che possono essere incorporati nelle proteine ricombinanti della presente descrizione al momento della traduzione. Alcuni vettori possono produrre trascritti di mRNA che comprendono segnali di esportazione nucleare. L'RNA trascritto da un vettore pTT5 modificato (pTT5-WPRE) contiene un elemento che facilita l'esportazione nucleare dei trascritti. Alcuni vettori possono essere modificati tramite inserzione di una o più cassette per clonaggio indipendenti da ligazione (LIC) per fornire un clonaggio più semplice.

I vettori codificanti per le proteine ricombinanti della presente descrizione possono essere veicolati alle cellule secondo qualunque metodo noto nella tecnica, includente, ma non limitato a trasfezione, elettroporazione e/o trasduzione. In alcuni casi, i vettori possono comprendere uno o più elementi per accrescere la replicazione del vettore nelle cellule ospiti. In alcuni casi, i vettori possono comprendere siti oriP per la replicazione episomale in cellule che esprimono EBNA-1.

In alcuni casi, le cellule vengono trasfettate stabilmente per produrre le proteine ricombinanti della presente descrizione. Le cellule trasfettate stabilmente passano i geni trasfettati alle cellule figlie durante la divisione cellulare, eliminando così la necessità di una trasfezione ripetuta. In alcuni casi, i geni trasfettati sono inseriti stabilmente nel genoma delle cellule trasfettate. I geni trasfettati possono comprendere geni per la selezione cellulare, quali i geni che conferiscono resistenza a uno o più composti tossici o repressivi. Tali geni possono essere usati per supportare la crescita delle sole cellule con incorporazione stabile dei geni trasfettati quando cresciute in presenza di tali uno o più composti tossici o repressivi (ad esempio puromicina, kenomicina, etc.) La selezione cellulare può anche comprendere la selezione di cellule basata sui livelli complessivi di espressione di proteina ricombinante. La determinazione di tali livelli può essere effettuata, ad esempio, tramite Western Blot e/o

ELISA.

In alcuni casi, le sequenze nucleotidiche codificanti per proteine ricombinanti della presente descrizione possono comprendere uno o più elementi regolatori post-trascrizionali del virus dell'epatite di marmotta (WPRE). Gli acidi nucleici RNA comprendenti tali elementi possono comprendere la sequenza  
GCCACGGCGGAACUCAUCGCCGCCUGCCUUGCCCCGUCUGGACAGGGGCUCGGC  
UGUUGGGCACUGACAAUCCGUGGU (SEQ ID NO: 255).

L'RNA comprendente i WPRE può essere trascritto da DNA comprendente la sequenza  
AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTT  
GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTGTATCATGCTATTGCTT  
CCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAG  
GAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCA  
ACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTT  
TCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGA  
CAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGT  
CCTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTG  
CTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCT  
CTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGG  
CCGCTCCCCGCCTG (SEQ ID NO: 256).

I WPRE possono accrescere la traduzione degli acidi nucleici comprendenti i WPRE. Tale traduzione accresciuta può essere dovuta a un'umentata esportazione citoplasmatica del mRNA appena trascritto.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti possono comprendere una o più sequenze segnale di secrezione. Come usato nella presente, il termine "sequenza segnale di secrezione" si riferisce a una catena di amminoacidi (o nucleotidi che li codificano a livello di acido nucleico) che quando fa parte di una proteina, modula la secrezione di tali proteine dalle cellule. Alcune sequenze segnale di secrezione possono essere localizzate ai terminali della proteina. In altri casi, le sequenze segnale di secrezione possono essere sequenze amminoacidiche N-terminali. Altre sequenze segnale di secrezione possono comprendere il segnale di secrezione delle catene kappa di Ig. Tali catene kappa di Ig possono essere catene kappa di Ig umana. In alcuni casi, le sequenze segnale di secrezione possono comprendere la sequenza amminoacidica MDMRVPAQLLGLLLWFSGVLG (SEQ ID NO: 257).

In alcune forme di realizzazione, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono richiedere co-

espressione con una o più altre proteine per un'espressione, un ripiegamento, una secrezione, un'attività e/o una funzione corretti. Alcuni GPC ricombinanti della presente descrizione possono essere co-espressi con LTBP, fibrilline e/o GARP

In alcuni casi, le proteine ricombinanti della presente descrizione possono essere biotinilate. Come usato nella presente, il termine "biotinilazione" si riferisce all'attacco di uno o più marcatori biotina. Tali marcatori biotina possono facilitare le interazioni di proteine ricombinanti biotinilate con superfici e/o proteine rivestite con avidina e/o streptavidina. Come usato nella presente, un "marcatore biotina" si riferisce a un marcatore rivelabile comprendente una o più molecole di biotina. Il termine "biotinilato" si riferisce a una molecola o una proteina che comprende uno o più marcatori biotina. Le molecole di biotina si legano con alta affinità alle molecole di avidina e streptavidina. Questa proprietà può essere usata per catturare le proteine biotinilate utilizzando materiali rivestiti con avidina e/o streptavidina. Alcuni GPC ricombinanti della presente descrizione possono essere biotinilati vicino all'N-terminale. Tali GPC ricombinanti possono essere introdotti in superfici per coltura cellulare rivestite con avidina/streptavidina, permettendo ai GPC ricombinanti biotinilati di aderire alla superficie in modo tale che l'orientamento e il legame di tali GPC legati mimi l'orientamento e il legame dei GPC alle LTBP, alle fibrilline e/o alle GARP.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti prodotte possono essere analizzate ai fini di controllo qualità per valutare le proprietà biofisiche come pure le proprietà bioattive. La caratterizzazione biofisica può includere la valutazione dei patterns di migrazione delle proteine dopo SDS-PAGE riducente e/o non riducente. La caratterizzazione biofisica può anche comprendere filtrazione su gel, analisi spettrometrica di massa e/o analisi di associazione/dissociazione tra LAP o domini LAP-simili e domini di fattore di crescita. Le proprietà bioattive possono essere analizzate valutando la reattività con anticorpi e/o l'attività di segnalazione di fattori di crescita dissociati e/o GPC latenti.

Alcune proteine prodotte possono comprendere amminoacidi aggiuntivi codificanti per uno o più marcatori rivelabili per la purificazione [ad es. tag poliistidina, flag tag, etc.] In alcuni casi, le proteine sono marcate all'N-terminale. In alcuni casi, le proteine sono marcate al C-terminale. In alcuni casi, le proteine sono biotinilate. In

alcune forme di realizzazione, le proteine ricombinanti della presente descrizione sono biotinilate all'N-terminale. Le proteine prodotte possono comprendere amminoacidi aggiuntivi codificanti per uno o più siti di clivaggio per proteasi 3C. Tali siti consentono il clivaggio tra residui Q e G del sito di clivaggio per proteasi 3C su trattamento con proteasi 3C, includente, ma non limitata a proteasi 3C di rhinovirus. In alcuni casi, tali siti di clivaggio vengono introdotti per consentire la rimozione dei marcatori rivelabili dalle proteine ricombinanti.

In alcuni casi, la modificazione delle proproteine dei fattori di crescita espresse può essere effettuata tramite clivaggio enzimatico. In alcuni casi, possono essere usate le proproteina convertasi. Tali proproteina convertasi possono includere, ma non sono limitate a furina/PACE3, PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PACE4 e PC7. Il clivaggio tramite proproteina convertasi può essere effettuato in soluzione o in coltura di tessuti. In alcuni casi, le proproteina convertasi vengono espresse nelle cellule esprimenti le proproteine da clivare. In alcuni casi, le proproteina convertasi vengono aggiunte a colture di tessuti di cellule esprimenti le proproteine da clivare.

#### *Anticorpi*

Composti e/o composizioni della presente invenzione comprendono anticorpi o frammenti degli stessi. Come usato nella presente, il termine "anticorpo" è riferito nel senso più ampio e copre specificamente varie forme di realizzazione includenti, ma non limitate a anticorpi monoclonali, anticorpi policlonali, anticorpi multispecifici (ad es. anticorpi bispecifici formati da almeno due anticorpi intatti), e frammenti anticorpali quali diabody purché esibiscano un'attività biologica desiderata. Gli anticorpi sono principalmente molecole a base di amminoacidi ma possono anche comprendere una o più modificazioni (includenti, ma non limitate all'aggiunta di porzioni carboidratiche, porzioni fluorescenti, tag chimici, etc.)

#### *Uso di proteine ricombinanti e chimeriche nella generazione di anticorpi*

In alcuni casi, le proteine ricombinanti e/o chimeriche descritte nella presente possono essere usate come antigeni (riferite nella presente come proteine antigeniche) per generare anticorpi. Tali proteine antigeniche possono comprendere epitopi che possono essere meno accessibili per la generazione di anticorpi in proteine wild type simili. Alcuni anticorpi diretti verso proteine antigeniche della presente descrizione possono modulare il rilascio di uno o più fattori di crescita da uno o più GPC.) Alcuni tali anticorpi possono essere anticorpi di stabilizzazione

[riduzione o prevenzione della dissociazione tra due agenti, (ad esempio rilascio del fattore di crescita dai GPC, rilascio di GPC da una o più interazioni proteiche)] e/o di rilascio [potenziamento della dissociazione tra due agenti (ad esempio rilascio del fattore di crescita dai GPC, rilascio di GPC da una o più interazioni proteiche)]. Le proteine antigeniche della presente descrizione possono comprendere proteine correlate a TGF- $\beta$  come pure componenti e/o moduli proteici delle stesse. In alcuni casi, le proteine antigeniche della presente descrizione possono comprendere prodomini senza fattori di crescita associati, mutanti deficienti per il clivaggio tramite furina, mutanti deficienti nelle associazioni con proteine extracellulari e/o combinazioni degli stessi.

In alcuni casi, le proteine antigeniche possono comprendere proteine correlate a TGF- $\beta$  e/o moduli delle stesse. Tali proteine antigeniche possono comprendere epitopi da regioni dove i fattori di crescita si associano o comprendono vicinanza stereologica con regioni di prodominio. Gli anticorpi della presente invenzione diretti verso tali epitopi possono legare regioni sovrapposte tra fattori di crescita e prodomini. Tali anticorpi possono inibire a livello stereologico la dissociazione dei fattori di crescita dai GPC.

In alcuni casi, le proteine antigeniche comprendono solo il prodominio o solo il fattore di crescita da un particolare GPC. Epitopi presenti su tali proteine antigeniche possono essere schermati o non esposti nei GPC intatti. Alcuni anticorpi della presente invenzione possono essere diretti verso tali epitopi. Tali anticorpi possono essere anticorpi di rilascio, promuovendo la dissociazione del fattore di crescita dai GPC. Ulteriori anticorpi possono competere con il fattore di crescita libero per il legame al prodominio, promuovendo così la dissociazione del fattore di crescita dai GPC.

In alcuni casi, le proteine antigeniche possono comprendere mutazioni nel sito di clivaggio per proproteina convertasi (ad esempio furina). Tali mutazioni possono impedire il clivaggio enzimatico dei fattori di crescita dai loro prodomini. Alcuni anticorpi della presente invenzione possono essere diretti verso epitopi presenti su tali proteine mutanti. Tali anticorpi possono stabilizzare l'associazione tra prodomini e fattori di crescita. In alcuni casi, mutanti nel sito di clivaggio per la furina comprendono mutanti D2G come descritti nella presente.

In alcuni casi, le proteine antigeniche comprendenti prodomini possono comprendere mutazioni N-terminali che portano a diminuita associazione del prodominio con LTBP e/o GARP e perciò possono presentare epitopi nella

regione N-terminale che altrimenti possono essere schermati da quelle associazioni. Alcuni anticorpi della presente invenzione possono essere diretti verso tali epitopi. Alcune proteine antigeniche comprendenti prodomini da TGF- $\beta$ 1 possono comprendere mutazioni C4S. Tali mutazioni possono impedire l'associazione delle proteine antigeniche con LTBP e/o GARP, rendendo queste proteine utili per la presentazione di epitopi N-terminali. Anticorpi diretti verso mutanti C4S possono impedire l'associazione di GPC con LTBP e/o GARP. Alcuni anticorpi diretti verso mutanti C4S possono ridurre la segnalazione del fattore di crescita in una particolare nicchia. Alcuni tali anticorpi possono ridurre o impedire il rilascio del fattore di crescita bloccando la capacità dei GPC di associarsi saldamente con la matrice extracellulare.

In alcuni casi, le proteine antigeniche possono comprendere una o più LTBP ricombinanti. Tali LTBP ricombinanti possono comprendere LTBP1, LTBP2, LTBP3, LTBP4, varianti di splicing alternativo e/o frammenti delle stesse. Le LTBP ricombinanti possono anche essere modificate per comprendere uno o più marcatori rivelabili. Tali marcatori rivelabili possono includere, ma non sono limitati a marcatori biotina, poliistidina tag, myc tag, HA tag e/o tag fluorescenti.

In alcuni casi, le proteine antigeniche possono comprendere una o più proteine ricombinanti e/o proteine chimeriche complessate con una o più LTBP ricombinanti. Alcune proteine antigeniche possono comprendere mutanti nel sito di clivaggio per proproteina convertasi (ad esempio mutanti D2G, mutanti AXXA) complessati con una o più LTBP ricombinanti. Alcune tali LTBP ricombinanti possono comprendere LTBP1S. Alcune LTBP ricombinanti possono comprendere uno o più marcatori rivelabili, includenti, ma non limitati a marcatori biotina, poliistidina tag e/o flag tag.

In alcuni casi, le proteine antigeniche possono comprendere GARP (o omologhi della stessa, includenti, ma non limitati a LRRC33). Tale GARP può essere ricombinante, riferita nella presente come GARP ricombinante. Alcune GARP ricombinanti possono comprendere una o più modificazioni, troncamenti e/o mutazioni rispetto a GARP wild type. Le GARP ricombinanti possono essere modificate per essere solubili. In altri casi, le GARP ricombinanti vengono modificate per comprendere uno o più marcatori rivelabili. In ulteriori casi, tali marcatori rivelabili possono includere, ma non sono limitati a marcatori biotina, poliistidina tag, flag tag, myc tag, HA tag e/o tag

fluorescenti. In alcuni casi, le proteine antigeniche possono comprendere una o più proteine ricombinanti e/o proteine chimeriche complessate con una o più GARP ricombinanti. In alcuni casi, le proteine antigeniche comprendono LAP (ad esempio LAP da TGF- $\beta$ ) e/o domini LAP-simili complessati con GARP ricombinante. In alcuni casi, le proteine antigeniche comprendono mutanti D2G (ad es. mutanti D2G di TGF- $\beta$ ) complessati con GARP ricombinante. In alcuni casi, GARP ricombinanti complessate possono essere forme solubili di GARP (sGARP). In alcuni casi, le sGARP comprendono uno o più marcatori biotina, poliistidina tag e/o flag tag.

In alcuni casi, GARP complessate con LAP e/o domini LAP-simili sono desiderate come antigeni, nei saggi e/o per lo sviluppo di anticorpi. In tali casi, i LAP e/o i domini LAP-simili possono comprendere mutazioni della CED. Tali LAP e/o domini LAP-simili possono essere espressi come GPC per facilitare ripiegamento, conformazione e/o espressione della proteina corretti, ma le mutazioni della CED presenti possono potenziare il rilascio del fattore di crescita, distaccando il complesso GARP-LAP (o dominio LAP-simile) desiderato. I complessi GARP-LAP (o dominio LAP-simile) possono essere utili come antigeni nella produzione di anticorpi di rilascio che prendono di mira specificamente i GPC associati con GARP.

In alcuni casi, i GPC comprendenti mutazioni della CED possono agire per stabilizzare una conformazione di LAP (o dominio LAP-simile) nativamente popolata caratterizzata da una ridotta associazione con il fattore di crescita (come LAP o domini LAP-simili liberi e/o come un complesso GARP e/o LTBP/LAP), esponendo così epitopi che possono essere meno esposti in proteine wild-type. Tali mutazioni possono spostare l'equilibrio conformazionale di LAP o domini LAP-simili per facilitare la produzione di anticorpi di attivazione.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti (inclusenti, ma non limitate a proteine chimeriche) descritte nella presente possono essere usate in studi per identificare e mappare epitopi che possono essere bersagli importanti per lo sviluppo di anticorpi. Tali studi possono essere usati per identificare epitopi che possono promuovere il rilascio del fattore di crescita o la stabilizzazione dei GPC su legame dell'anticorpo.

#### *Anticorpi di rilascio*

Come usato nella presente, il termine "anticorpo di rilascio" si riferisce a un anticorpo che aumenta il rapporto del fattore di crescita attivo e/o libero rispetto al fattore di crescita inattivo e/o associato al prodominio in seguito

all'introduzione dell'anticorpo in un GPC, una cellula, una nicchia, un deposito naturale o in qualunque altro sito di sequestro del fattore di crescita. In questo contesto, gli anticorpi di rilascio possono essere caratterizzati come agonisti. Come usato nella presente, il termine "deposito naturale" si riferisce a un luogo all'interno di una cellula, un tessuto o un organo dove vengono immagazzinati aumentati livelli di una biomolecola o uno ione. Ad esempio, la matrice extracellulare può agire come un deposito naturale per uno o più fattori di crescita.

Il contatto necessario per il rilascio del fattore di crescita può essere definito come contatto diretto o indiretto dell'anticorpo con un GPC o un componente dello stesso o con una struttura cellulare quale una proteina della matrice extracellulare e/o cellulare e/o una proteina associata con la matrice extracellulare e/o cellulare [ad es. LTBP (ad es. LTBP1, LTBP2, LTBP3 e/o LTBP4), fibrilline (ad es. fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3 e/o fibrillina-4,) perlecano, decorina, elastina, collagene e/o GARP (ad es. GARP e/o LRRC33)] per il rilascio del fattore di crescita. Un rilascio di almeno 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o più del fattore di crescita è sufficiente per caratterizzare gli anticorpi della presente invenzione come anticorpi di rilascio. Resta inteso che il rilascio del fattore di crescita dopo la somministrazione dell'anticorpo può essere locale e può verificarsi per un periodo di tempo sostenuto e può includere picchi o punte di rilascio. Gli anticorpi della presente invenzione possono agire per rilasciare uno o più fattori di crescita nel corso di minuti, ore, giorni o più a lungo.

I profili di rilascio possono avere un picco o "burst" iniziale entro da circa 4 ore a circa 7 giorni dal contatto *in vivo* o entro periodi più brevi *in vitro*. Ad esempio, il picco o "burst" iniziale può verificarsi a da circa 4 ore a circa 5 ore, o da circa 4 ore a circa 6 ore, o da circa 4 ore a circa 7 ore, o da circa 4 ore a circa 8 ore, o da circa 4 ore a circa 9 ore, o da circa 4 ore a circa 10 ore, o da circa 4 ore a circa 11 ore, o da circa 4 ore a circa 12 ore, o da circa 4 ore a circa 24 ore, o da circa 4 ore a circa 36 ore, o da circa 4 ore a circa 48 ore, o da circa 1 giorno a circa 7 giorni, o da circa 1 giorno a circa 2 giorni, o da circa 1 giorno a circa 3 giorni, o da circa 1 giorno a circa 4 giorni, o da circa 4 giorni a circa 5 giorni, o da circa 4 giorni a circa 6 giorni, o da circa 4 giorni a circa 7 giorni. Composti e/o composizioni della presente invenzione possono stimolare il rilascio di dal 5 al 100% del fattore di crescita presente. Ad esempio, la percentuale di rilascio del fattore di crescita può essere da circa 5% a circa 10%, o da circa 5% a circa 15%, o da circa 5% a circa 20%, o da circa 5% a circa 25%, o da circa 10% a circa 30%, o da

circa 10% a circa 40%, o da circa 10% a circa 50%, o da circa 10% a circa 60%, o da circa 20% a circa 70%, o da circa 20% a circa 80%, o da circa 40% a circa 90%, o da circa 40% a circa 100%.

Gli anticorpi di rilascio generati secondo i metodi descritti nella presente possono essere generati per rilasciare fattori di crescita dai GPC comprendenti qualunque delle pro-proteine elencate nella Tabella 1. In alcuni casi, gli anticorpi di rilascio sono diretti verso GPC comprendenti isoforme di TGF- $\beta$  e/o uno o più moduli di tali isoforme. In alcuni casi, gli anticorpi di rilascio sono diretti verso GPC comprendenti GDF e/o uno o più moduli dai GDF.

#### *Anticorpi di stabilizzazione*

Come usato nella presente, il termine "anticorpo di stabilizzazione" si riferisce a un anticorpo che diminuisce il rapporto del fattore di crescita attivo e/o libero rispetto al fattore di crescita inattivo e/o associato con il prodominio in seguito all'introduzione dell'anticorpo in uno o più GPC, cellule, nicchie, depositi naturali e/o qualunque altro sito di sequestro del fattore di crescita. In questo contesto, gli anticorpi possono essere caratterizzati come antagonisti. Come usato nella presente, un "antagonista" è uno che interferisce con o inibisce l'azione fisiologica di un altro. L'azione dell'antagonista può anche comportare stimolazione o attivazione di segnalazione a valle e perciò può agire agonisticamente rispetto ad un altro pathway, separato da quello che viene antagonizzato. I pathway sono interconnessi, così, in un esempio non limitante, un antagonista del TGF- $\beta$  potrebbe agire come un agonista di BMP e viceversa. Nel contesto degli eventi cellulari, come usato nella presente, il termine "a valle" si riferisce a qualunque segnalazione o evento cellulare che si verifica dopo l'azione, il legame o il bersagliamento da parte dei composti e/o delle composizioni della presente invenzione.

Il contatto necessario per l'inibizione o la stabilizzazione può essere un contatto diretto o indiretto tra anticorpo e GPC o componenti dello stesso o con strutture cellulari quali una proteina della matrice extracellulare e/o cellulare e/o una proteina associata con la matrice extracellulare e/o cellulare [ad es. LTBP (ad es. LTBP1, LTBP2, LTBP3 e/o LTBP4), fibrilline (ad es. fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3 e/o fibrillina-4,) perlecano, decorina, elastina, collagene e/o GARP (ad es. GARP e/o LRRC33)] per cui viene inibito il rilascio del fattore di crescita. Un'inibizione del rilascio di almeno 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o più di fattori di crescita può essere sufficiente, in alcuni casi, per caratterizzare gli anticorpi della presente invenzione come

inibitori o stabilizzatori. Gli anticorpi inibitori possono stabilizzare i GPC ed intrappolarli come eterodimeri.

Resta inteso che l'inibizione del rilascio del fattore di crescita dopo il contatto con uno o più anticorpi della presente invenzione può essere locale e può verificarsi per un periodo di tempo sostenuto e può includere picchi, valli o punte. Anticorpi inibitori che possono funzionare anche per stabilizzare i GPC possono essere definiti dalla loro cinetica di rilascio. Il rilascio di fattore di crescita e la corrispondente cinetica di rilascio, anche localmente, può essere misurata direttamente o dedotta dagli eventi di segnalazione a valle. In alcune forme di realizzazione, variazioni in concentrazioni di proteina o di acido nucleico o in risposte fenotipiche possono essere indicative degli effetti di composti e/o composizioni della presente invenzione.

Gli anticorpi della presente invenzione possono agire per inibire il rilascio di un fattore di crescita nel corso di minuti, ore o giorni. I profili di inibizione e/o stabilizzazione possono avere una valle iniziale entro da circa 4 ore a circa 7 giorni dall'introduzione *in vivo* o periodi più brevi *in vitro*. Ad esempio, una valle iniziale di inibizione o stabilizzazione può verificarsi a da circa 4 ore a circa 5 ore, o da circa 4 ore a circa 6 ore, o da circa 4 ore a circa 7 ore, o da circa 4 ore a circa 8 ore, o da circa 4 ore a circa 9 ore, o da circa 4 ore a circa 10 ore, o da circa 4 ore a circa 11 ore, o da circa 4 ore a circa 12 ore, o da circa 4 ore a circa 24 ore, o da circa 4 ore a circa 36 ore, o da circa 4 ore a circa 48 ore, o da circa 1 giorno a circa 7 giorni, o da circa 1 giorno a circa 2 giorni, o da circa 1 giorno a circa 3 giorni, o da circa 1 giorno a circa 4 giorni, o da circa 4 giorni a circa 5 giorni, o da circa 4 giorni a circa 6 giorni, o da circa 4 giorni a circa 7 giorni. L'introduzione di composti e/o composizioni della presente invenzione può portare a un'inibizione e/o una stabilizzazione di da 5% a 100% del fattore di crescita presente. Per esempio, la percentuale di inibizione o stabilizzazione del fattore di crescita può essere da circa 5% a circa 10%, da circa 5% a circa 15%, da circa 5% a circa 20%, da circa 5% a circa 25%, da circa 10% a circa 30%, da circa 10% a circa 40%, da circa 10% a circa 50%, da circa 10% a circa 60%, da circa 20% a circa 70%, da circa 20% a circa 80%, da circa 40% a circa 90% o da circa 40% a circa 100%.

Gli anticorpi di stabilizzazione generati secondo i metodi descritti nella presente possono essere generati per bloccare il rilascio di fattori di crescita dai GPC comprendenti qualunque delle pro-proteine elencate nella Tabella 1. Tali anticorpi possono interagire fisicamente con siti di clivaggio per proteasi in GPC e/o bloccare l'interazione

di enzimi proteolitici che possono prendere di mira tali siti di clivaggio. In alcuni casi, gli anticorpi di stabilizzazione sono diretti verso GPC comprendenti isoforme di TGF- $\beta$  e/o uno o più moduli di tali isoforme. In alcuni casi, gli anticorpi di stabilizzazione sono diretti verso GPC comprendenti GDF e/o uno o più moduli da GDF.

Gli anticorpi di stabilizzazione diretti verso GPC comprendenti GDF-8 possono bloccare il clivaggio tramite metalloproteinasi di tali complessi. Tali agenti possono legarsi a GPC comprendenti GDF-8 in modo da impedire fisicamente le interazioni tra tali GPC e le metalloproteinasi che prendono di mira tali GPC. Agenti che effettivamente prendono di mira le metalloproteinasi stesse sono stati descritti in precedenza (si veda il Brevetto US No. US 7,572,599)

#### *Selezione di anticorpi*

Un anticorpo desiderato può essere selezionato da un pool più grande di due o più anticorpi candidati in base alla capacità dell'anticorpo desiderato di associarsi con antigeni e/o epitopi desiderati. Tali antigeni e/o epitopi possono includere, ma non sono limitati a qualunque di quelli descritti nella presente, includenti, ma non limitati a proteine ricombinanti, proteine chimeriche, GPC, prodomini (ad es. LAP o domini LAP-simili), fattori di crescita, moduli proteici, LTBP, fibrilline, GARP, proteine correlate a TGF- $\beta$ - e/o mutanti e/o varianti e/o complessi e/o combinazioni degli stessi. La selezione di anticorpi desiderati può essere effettuata utilizzando un saggio di legame degli anticorpi, quale un saggio basato su risonanza plasmonica di superficie, un saggio di immunoassorbente legato ad un enzima (ELISA) o un saggio basato su selezione cellulare attivata da fluorescenza (FACS). Tali saggi possono utilizzare un antigene desiderato per legare un anticorpo desiderato e poi usare uno o più metodi di rivelazione per rivelare il legame.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere selezionati da un pool più grande di due o più anticorpi candidati in base alla loro capacità di associarsi con i desiderati antigeni e/o epitopi da più specie (riferita nella presente come "selezione positiva").

In alcune forme di realizzazione, tali specie possono comprendere specie di vertebrato. In alcune forme di realizzazione, tali specie possono comprendere specie di mammifero. In alcune forme di realizzazione, tali specie

possono includere, ma non sono limitate a topi, ratti, conigli, capre, pecore, maiali, cavalli, mucche e/o esseri umani.

In alcune forme di realizzazione, una selezione negativa viene utilizzata per rimuovere anticorpi da un pool più grande di due o più anticorpi candidati. Come usato nella presente il termine "selezione negativa" si riferisce all'eliminazione di uno o più fattori da un gruppo in base alla loro capacità di legarsi a uno o più antigeni e/o epitopi indesiderati. In alcune forme di realizzazione, antigeni e/o epitopi indesiderati possono includere, ma non sono limitati a qualunque di quelli descritti nella presente, includenti, ma non limitati a proteine ricombinanti, proteine chimeriche, GPC, prodomini (ad es. LAP o domini LAP-simili), fattori di crescita, moduli proteici, LTBP, fibrilline, GARP, proteine correlate a TGF- $\beta$  e/o mutanti e/o varianti e/o combinazioni e/o complessi degli stessi.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere diretti verso prodomini (ad es. la porzione prodominio di un GPC e/o LAP o domini LAP-simili liberi) che diminuiscono la segnalazione e/o i livelli del fattore di crescita (ad es. segnalazione e/o livelli del fattore di crescita TGF- $\beta$ 1) in una data nicchia. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere diretti verso LAP o domini LAP-simili che aumentano la segnalazione e/o i livelli del fattore di crescita in una data nicchia. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere diretti verso prodomini (ad esempio LAP o domini LAP-simili) e/o GPC solo quando complessati con LTBP, fibrilline e/o GARP

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere selezionati da un pool più grande di due o più anticorpi candidati in base alla loro capacità di modulare livelli e/o attività del fattore di crescita. In alcuni casi, saggi di attività del fattore di crescita possono essere usati per testare la capacità di anticorpi candidati di modulare l'attività del fattore di crescita. Saggi di attività del fattore di crescita possono includere, saggi basati su cellule come descritto qui di seguito nella presente. Ulteriori saggi che possono essere usati per determinare l'effetto di anticorpi candidati sull'attività del fattore di crescita possono includere, ma non sono limitati a saggio di immunoassorbente legato ad un enzima (ELISA), Western blotting, saggi mediante reporter (ad es. saggi reporter basati su luciferasi o saggi reporter basati su altro enzima), analisi PCR, analisi RT-PCR e/o altri metodi noti nella tecnica includenti qualunque dei metodi descritti nelle Domande di Brevetto Provvisorie

degli Stati Uniti 61/722,919, depositata il 6 Novembre 2012 e 61/722,969, depositata il 6 Novembre 2012.

In alcune forme di realizzazione, una o più proteine ricombinanti o anticorpi descritti nella presente possono essere usati in saggi per testare, sviluppare e/o selezionare anticorpi. GPC ricombinanti possono essere espressi per testare le capacità di rilascio e/o stabilizzazione di uno o più anticorpi che vengono sottoposti a saggio. In alcune forme di realizzazione, le proteine ricombinanti possono essere espresse come componenti di controllo positivo o negativo dei saggi. In alcune forme di realizzazione, più proteine ricombinanti possono essere espresse contemporaneamente per modulare il rilascio e/o l'attività del fattore di crescita, in cui tali proteine ricombinanti possono agire sinergicamente o antagonisticamente in tale modulazione.

In alcune forme di realizzazione GPC comprendenti mutazioni della CED possono fornire un livello basale di attività del fattore di crescita in saggi progettati per testare anticorpi di rilascio, poiché queste proteine mutanti sono sufficienti per produrre un effetto biologico negli esseri umani. In alcune forme di realizzazione, GPC comprendenti mutazioni della CED possono essere usati come controlli positivi in saggi di attività orientati allo screening per anticorpi di rilascio. In alcune forme di realizzazione, GPC comprendenti mutazioni della CED possono essere usati per lo screening per l'attività di anticorpo di stabilizzazione, poiché essi possono essere presumibilmente attivati in assenza di integrine. In tali saggi, GPC comprendenti mutazioni della CED possono essere espressi in linee cellulari (ad es. cellule 293 o altre) e l'attività e/o il rilascio del fattore di crescita possono essere valutati in presenza o in assenza degli anticorpi che vengono testati. In alcune forme di realizzazione, la co-espressione di GPC comprendenti mutazione della CED con GPC wild-type (inclusi, ma non limitati a TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, o TGF- $\beta$ 3) potrebbe anche essere usata per regolare i livelli del fattore di crescita libero. In tali forme di realizzazione, la modulazione dei livelli del fattore di crescita libero può essere realizzata tramite co-trasfezione di differenti rapporti di GPC wild-type e mutanti (ad es. 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10). In alcune forme di realizzazione, ulteriore co-espressione di LTBP, fibrilline o GARP può essere effettuata per aggiungere una o più ulteriori modulazioni di livelli del fattore di crescita libero.

#### *Sviluppo di anticorpi*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione comprendenti anticorpi,

frammenti anticorpali, loro varianti o derivati come descritto sopra sono specificamente immunoreattivi con proteine antigeniche come descritte nella presente.

Gli anticorpi della presente invenzione possono essere caratterizzati dalla/e loro molecola/e bersaglio, dagli antigeni usati per generarli, dalla loro funzione (se come agonisti, antagonisti, rilascianti il fattore di crescita, stabilizzanti, attivanti e/o inibenti i GPC) e/o dalla nicchia cellulare in cui operano.

Come usato nella presente il termine, "frammento anticorpale" si riferisce a qualunque porzione di un anticorpo intatto. In alcune forme di realizzazione, i frammenti anticorpali comprendono le regioni leganti l'antigene dagli anticorpi intatti. Esempi di frammenti anticorpali possono includere, ma non sono limitati ai frammenti Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, e Fv; diabody; anticorpi lineari; molecole di anticorpi a catena singola; ed anticorpi multispecifici formati da frammenti anticorpali. La digestione mediante papaina degli anticorpi produce due frammenti leganti l'antigene identici, chiamati frammenti "Fab", ciascuno con un singolo sito legante l'antigene. Anche prodotto è un frammento "Fc" residuo, il cui nome riflette la sua capacità di cristallizzare facilmente. Il trattamento con pepsina produce un frammento F(ab')<sub>2</sub> che ha due siti leganti l'antigene ed è ancora capace di reticolazione dell'antigene. Composti e/o composizioni della presente invenzione possono comprendere uno o più di questi frammenti. Per gli scopi nella presente, un "anticorpo" può comprendere un dominio variabile pesante e leggero come pure una regione Fc.

Come usato nella presente, il termine "anticorpo nativo" si riferisce a una glicoproteina solitamente eterotetrameric di circa 150000 dalton, composta da due catene leggere (L) identiche e due catene pesanti (H) identiche. Ciascuna catena leggera è legata a una catena pesante tramite un legame covalente disolfuro, sebbene il numero di legami disolfuro vari tra le catene pesanti dei diversi isotipi immunoglobulinici. Ciascuna catena pesante e leggera ha anche ponti disolfuro intracatena regolarmente distanziati. Ogni catena pesante ha ad un'estremità un dominio variabile (V<sub>H</sub>) seguito da un certo numero di domini costanti. Ogni catena leggera ha un dominio variabile (V<sub>L</sub>) ad un'estremità e un dominio costante alla sua altra estremità; il dominio costante della catena leggera è allineato con il primo dominio costante della catena pesante, e il dominio variabile della catena leggera è allineato con il dominio variabile della catena pesante.

Come usato nella presente, il termine "dominio variabile" si riferisce a specifici domini degli anticorpi che differiscono ampiamente nella sequenza tra gli anticorpi e vengono usati nel legame e nella specificità di ogni particolare anticorpo per il suo particolare antigene.

Come usato nella presente, il termine "Fv" si riferisce a frammenti anticorpali comprendenti siti di riconoscimento dell'antigene e di legame all'antigene completi. Queste regioni sono costituite da un dimero di un dominio variabile di catena pesante e uno di catena leggera in stretta associazione non covalente.

Come usato nella presente, il termine "catena leggera" si riferisce a un componente di un anticorpo da qualunque specie di vertebrato assegnato a uno di due tipi chiaramente distinti, chiamati kappa e lambda in base alle sequenze amminoacidiche dei domini costanti. A seconda della sequenza amminoacidica del dominio costante delle loro catene pesanti, gli anticorpi possono essere assegnati a differenti classi. Esistono cinque classi principali di anticorpi intatti: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e diverse di queste possono essere ulteriormente suddivise in sottoclassi (isotipi), ad esempio, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2.

Come usato nella presente, il termine "Fv a singola catena" o "scFv" si riferisce a una proteina di fusione dei domini anticorpali  $V_H$  e  $V_L$ , in cui questi domini sono legati insieme in una singola catena polipeptidica. In alcune forme di realizzazione, il linker polipeptidico di Fv consente al scFv di formare la struttura desiderata per il legame all'antigene.

Come usato nella presente, il termine "anticorpo bispecifico" si riferisce a un anticorpo capace di legare due antigeni differenti. Tali anticorpi tipicamente comprendono regioni da almeno due anticorpi differenti. Gli anticorpi bispecifici possono includere qualunque di quelli descritti in Riethmuller, G. 2012. *Cancer Immunity*. 12:12-18, Marvin, J.S. et al., 2005. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26(6):649-58 e Schaefer, W. et al., 2011. *PNAS*. 108(27):11187-92.

Come usato nella presente, il termine "diabody" si riferisce a un piccolo frammento anticorpale con due siti leganti l'antigene. I diabody comprendono un dominio variabile della catena pesante  $V_H$  connesso a un dominio variabile della catena leggera  $V_L$  nella stessa catena polipeptidica. Utilizzando un linker che è troppo corto per consentire l'accoppiamento tra i due domini sulla stessa catena, i domini sono costretti ad accoppiarsi con i domini

complementari di un'altra catena e creano due siti leganti l'antigene. I diabody sono descritti in modo più completo, ad esempio, in EP 404,097; WO 93/11161; e in Hollinger et al. (. (Hollinger, P. et al., "Diabodies": Small bivalent and bispecific antibody fragments. PNAS. 1993. 90:6444-8). Come usato nella presente, il termine "anticorpo monoclonale" si riferisce a un anticorpo ottenuto da una popolazione di cellule sostanzialmente omogenee (o cloni), cioè, i singoli anticorpi comprendenti la popolazione sono identici e/o legano lo stesso epitopo, ad eccezione di possibili varianti che possono insorgere durante la produzione degli anticorpi monoclonali, tali varianti generalmente essendo presenti in quantità minori. In contrasto alle preparazioni di anticorpi policlonali che tipicamente includono anticorpi diversi diretti contro determinanti (epitopi) diversi, ciascun anticorpo monoclonale è diretto contro un singolo determinante sull'antigene

Il modificatore "monoclonale" indica il carattere dell'anticorpo come ottenuto da una popolazione sostanzialmente omogenea di anticorpi, e non deve essere interpretato nel senso che si richieda la produzione dell'anticorpo tramite qualunque particolare metodo. Gli anticorpi monoclonali nella presente includono anticorpi (immunoglobuline) "chimerici" in cui una porzione della catena pesante e/o leggera è identica o omologa a sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da una particolare specie o appartenenti a una particolare classe o sottoclasse di anticorpi, mentre il resto della/e catena/e è identico o omologo a sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da un'altra specie o appartenenti a un'altra classe o sottoclasse di anticorpi, come pure frammenti di tali anticorpi.

Come usato nella presente, il termine "anticorpo umanizzato" si riferisce a un anticorpo chimerico comprendente una porzione minima da una o più fonti di anticorpi non umani (ad esempio, murini) con il resto derivato da una o più fonti di immunoglobuline umane. Per la maggior parte, gli anticorpi umanizzati sono immunoglobuline umane (anticorpo del ricevente) in cui residui dalla regione ipervariabile da un anticorpo del ricevente sono sostituiti con residui dalla regione ipervariabile da un anticorpo di una specie non umana (anticorpo del donatore) quale topo, ratto, coniglio o primate non umano avente la desiderata specificità, affinità, e/o capacità.

Come usato nella presente, il termine "regione ipervariabile" si riferisce a regioni all'interno del dominio di legame all'antigene di un anticorpo comprendenti residui amminoacidici responsabili del legame all'antigene. Gli amminoacidi presenti all'interno delle regioni ipervariabili determinano la struttura della regione determinante la

complementarietà (CDR). Come usato nella presente, il termine "CDR" si riferisce a regioni di anticorpi comprendenti una struttura che è complementare al suo antigene o epitopo bersaglio.

In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente descrizione possono essere mimetici di anticorpi. Come usato nella presente, il termine "mimetico di anticorpo" si riferisce a qualunque molecola che mima la funzione o l'effetto di un anticorpo e che si lega specificamente e con alta affinità ai loro bersagli molecolari. In alcuni casi, i mimetici di anticorpi possono essere monobody, progettati per incorporare il dominio di tipo III della fibronectina (Fn3) come una impalcatura proteica (US 6,673,901; US 6,348,584). In alcuni casi, i mimetici di anticorpi possono essere quelli noti nella tecnica includenti, ma non sono limitati a molecole di affibody, affiline, affitine, anticaline, avimeri, Centyrins, DARPINS™, Fynomers e peptidi Kunitz e dominio. In altri casi, mimetici di anticorpi possono includere una o più regioni non peptidiche.

Come usato nella presente, il termine "variante di anticorpo" si riferisce a una biomolecola somigliante a un anticorpo nella struttura e/o nella funzione comprendente alcune differenze nella sua sequenza amminoacidica, composizione o struttura rispetto a un anticorpo nativo.

La preparazione di anticorpi, che siano monoclonali o policlonali, è nota nella tecnica. Metodi per la produzione di anticorpi sono ben noti nella tecnica e descritti, ad esempio in Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 e "Therapeutic Antibody Engineering: Current and Future Advances Driving the Strongest Growth Area in the Pharmaceutical Industry" Woodhead Publishing, 2012.

#### *Generazione di anticorpi monoclonali standard*

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi vengono generati in topi knockout, mancanti del gene che codifica per gli antigeni bersaglio desiderati. Tali topi non possono essere tolleranti verso gli antigeni bersaglio e perciò possono essere meglio adatti per generare anticorpi contro tali antigeni che possono cross-reagire con forme umane e murine dell'antigene. Per la produzione di anticorpi monoclonali, i topi ospiti possono essere immunizzati con proteine ricombinanti per suscitare linfociti che si legano specificamente a tali proteine. I linfociti risultanti possono essere raccolti e fusi con linee cellulari immortalizzate. Le cellule di ibridoma risultanti possono essere

coltivate in terreno di coltura adatto con agenti di selezione per supportare la crescita delle sole cellule fuse.

Le linee cellulari di ibridoma desiderate possono essere identificate attraverso analisi della specificità di legame degli anticorpi secreti per i peptidi bersaglio e i cloni di tali cellule possono essere sottoclonati attraverso procedure della diluizione limite e cresciuti tramite metodi standard. Anticorpi prodotti dalle cellule di ibridoma sottoclonate possono essere isolati e purificati dal terreno di coltura tramite procedure di purificazione delle immunoglobuline standard

#### *Anticorpi ricombinanti*

Gli anticorpi ricombinanti della presente invenzione possono essere generati secondo qualunque dei metodi descritti nelle Domande di Brevetto Provvisorie degli Stati Uniti 61/722,919, depositata il 6 Novembre 2012 e 61/722,969, depositata il 6 Novembre 2012. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi ricombinanti possono essere prodotti utilizzando cellule di ibridoma prodotte secondo i metodi descritti nella presente. Sequenze di cDNA di regione variabile della catena leggera e pesante di anticorpi possono essere determinate utilizzando tecniche di biochimica standard. L'RNA totale può essere estratto dalle cellule di ibridoma producenti anticorpi e convertito in cDNA tramite trascrittasi inversa (RT) reazione a catena della polimerasi (PCR). L'amplificazione tramite PCR può essere effettuata sul cDNA risultante per amplificare i geni di regione variabile. Tale amplificazione può comprendere l'uso di primers specifici per l'amplificazione di sequenze della catena pesante e leggera. I prodotti di PCR risultanti possono poi essere sottoclonati in plasmidi per l'analisi della sequenza. Una volta sequenziate, le sequenze codificanti per gli anticorpi possono essere inserite in vettori di espressione. Per l'umanizzazione, è possibile utilizzare sequenze codificanti per domini costanti di catena pesante e leggera umana per sostituire le sequenze murine omologhe. I costrutti risultanti possono poi essere trasfettati in cellule di mammifero per la traduzione su grande scala.

#### *Sviluppo di anticorpi citotossici*

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere in grado di indurre citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), citotossicità complemento-dipendente (CDC) e/o fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (ADCP.) L'ADCC è un meccanismo immunitario per cui le cellule

vengono lisate come risultato di attacco da parte delle cellule immunitarie. Tali cellule immunitarie possono includere cellule CD56+, cellule naturale killer (NK) CD3-, monociti e neutrofili (Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 8, p186)

In alcuni casi, gli anticorpi della presente invenzione possono essere ingegnerizzati per comprendere un dato isotipo a seconda che si desideri o meno ADCC o ADCP al momento del legame dell'anticorpo. Tali anticorpi, ad esempio, possono essere ingegnerizzati secondo qualunque dei metodi descritti da Alderson, K.L. et al., J Biomed Biotechnol. 2011. 2011:379123). Nel caso degli anticorpi murini, isotipi di anticorpi diversi sono più efficaci nel promuovere ADCC. IgG2a, ad esempio, è più efficace nell'indurre ADCC di quanto lo sia IgG2b. Alcuni anticorpi della presente invenzione, comprendenti anticorpi murini IgG2b possono essere ri-ingegnerizzati per comprendere anticorpi IgG2a. Tali anticorpi ri-ingegnerizzati possono essere più efficaci nell'indurre ADCC al momento del legame agli antigeni associati a cellule.

In alcune forme di realizzazione, geni codificanti per regioni variabili di anticorpi sviluppati secondo metodi della presente invenzione possono essere clonati in vettori di espressione in mammifero codificanti per regioni Fc umane. Tali regioni Fc possono comprendere regioni Fc da IgG1 $\kappa$  umana. Regioni Fc da IgG1 $\kappa$  possono comprendere mutazioni amminoacidiche che è noto che accrescono il legame al recettore per Fc e la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente ADCC.

In alcuni casi, gli anticorpi possono essere ingegnerizzati per ridurre l'ADCC. Anticorpi che non attivano ADCC o che sono associati a livelli ridotti di ADCC possono essere desiderabili per forme di realizzazione di anticorpi della presente invenzione, in alcuni casi per via di una clearance immuno-mediata assente o limitata, che permette emivite in circolazione più lunghe.

#### *Tecniche di screening di librerie di esposizione di frammenti anticorpali*

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere prodotti e/o ottimizzati utilizzando metodi di scoperta ad alto rendimento. Tali metodi possono includere qualunque delle tecniche di esposizione (ad es. tecniche di screening di librerie di esposizione) descritte nelle Domande di Brevetto Provvisorie degli Stati Uniti 61/722,919, depositata il 6 Novembre 2012 e 61/722,969, depositata il 6 Novembre 2012. In

alcune forme di realizzazione, anticorpi sintetici possono essere progettati, selezionati o ottimizzati tramite screening di antigeni bersaglio utilizzando tecnologie di esposizione (ad es. tecnologie di esposizione su fago.) Le librerie di esposizione su fago possono comprendere da milioni a miliardi di particelle fagiche, ciascuna delle quali esprime frammenti anticorpali unici sul suo coat virale. In alcuni casi, il cDNA codificante per ciascun frammento può contenere la stessa sequenza ad eccezione di sequenze uniche codificanti per i loop variabili delle regioni determinanti la complementarità (CDR). Le catene  $V_H$  delle CDR possono essere espresse come una proteina di fusione, legate a proteine del coat virale (ad es. l'N-terminale della proteina del coat virale pIII.) Le catene  $V_L$  possono essere espresse separatamente per l'assemblaggio con le catene  $V_H$  nel periplasma prima dell'incorporazione del complesso nei coat virali.

Per la selezione, gli antigeni bersaglio possono essere incubati, *in vitro*, con particelle della libreria di esposizione su fago per la precipitazione di partners di legame positivi. Questo procedimento è riferito nella presente come "arricchimento in fagi". In alcuni casi, l'arricchimento in fagi comprende l'arricchimento in fagi in fase solida. Secondo tale arricchimento, gli antigeni bersaglio sono legati a un substrato (ad es. tramite adsorbimento passivo) e messi a contatto con una o più soluzioni comprendenti le particelle fagiche. Le particelle fagiche con affinità per tali antigeni bersaglio vengono precipitate dalla soluzione. In alcuni casi, l'arricchimento in fagi comprende arricchimento in fagi in fase di soluzione dove gli antigeni bersaglio sono presenti in una soluzione che viene combinata con le soluzioni dei fagi. Secondo tali metodi, gli antigeni bersaglio possono comprendere marcatori rivelabili (ad es. marcatori biotina) per facilitare lo smascheramento dalla soluzione e il recupero del fago legato. Dopo la selezione, il cDNA codificante per le CDR dei membri della libreria precipitati può essere sequenziato dal fago legato. Tali sequenze possono essere incorporate direttamente in sequenze di anticorpi per la produzione di anticorpi ricombinanti, o mutate ed utilizzate per ulteriore ottimizzazione attraverso maturazione di affinità *in vitro*.

In alcuni casi lo screening mediante esposizione su fago può essere usato per generare pannelli di anticorpi ampiamente diversi. Tale diversità può essere misurata come diversità delle sequenze degli anticorpi e/o diversità degli epitopi mirati.

*Tecniche di maturazione dell'affinità*

Tecniche di maturazione dell'affinità della presente descrizione possono comprendere qualunque di quelle descritte nelle Domande di Brevetto Provvisorie degli Stati Uniti 61/722,919, depositata il 6 Novembre 2012 e 61/722,969, depositata il 6 Novembre 2012. Dopo che frammenti anticorpali capaci di legare gli antigeni bersaglio vengono identificati (ad es. attraverso l'uso di librerie di esposizione su fago come descritto sopra,) mutanti ad alta affinità possono essere derivati da questi attraverso il processo di maturazione dell'affinità. La tecnologia della maturazione dell'affinità viene usata per identificare sequenze codificanti per CDR che hanno la più alta affinità per gli antigeni bersaglio. Utilizzando tali tecnologie, sequenze di CDR selezionate (ad esempio quelle che sono state isolate o prodotte secondo i procedimenti descritti nella presente) possono essere mutate in modo casuale nella loro totalità o in specifici residui per creare da milioni a miliardi di varianti. Tali varianti possono essere sottoposte a ripetuti cicli di screening di affinità (ad es. screening di libreria di esposizione) per la loro capacità di legare gli antigeni bersaglio. Tali ripetuti cicli di selezione, mutazione ed espressione possono essere effettuati per identificare sequenze di frammenti anticorpali con la più alta affinità per gli antigeni bersaglio. Tali sequenze possono essere direttamente incorporate nelle sequenze di anticorpi per la produzione di anticorpi ricombinanti.

*Caratterizzazione degli anticorpi*

Composti e/o composizioni della presente invenzione comprendenti anticorpi possono agire per diminuire la concentrazione locale di uno o più GPC attraverso rimozione tramite fagocitosi, pinocitosi, o inibendo l'assemblaggio nella matrice extracellulare e/o nella matrice cellulare. L'introduzione di composti e/o composizioni della presente invenzione può portare alla rimozione del 5% - 100% del fattore di crescita presente in una data area. Ad esempio, la percentuale di rimozione di fattore di crescita può essere da circa 5% a circa 10%, da circa 5% a circa 15%, da circa 5% a circa 20%, da circa 5% a circa 25%, da circa 10% a circa 30%, da circa 10% a circa 40%, da circa 10% a circa 50%, da circa 10% a circa 60%, da circa 20% a circa 70%, da circa 20% a circa 80%, da circa 40% a circa 90% o da circa 40% a circa 100%.

Le misurazioni di rilascio, inibizione o rimozione di uno o più fattori di crescita possono essere fatte in relazione

a uno standard o al rilascio o all'attività naturale del fattore di crescita in condizioni fisiologiche normali, *in vitro* o *in vivo*. Le misurazioni possono anche essere fatte in relazione alla presenza o all'assenza di anticorpi. Tali metodi di misurazione di livelli, rilascio, inibizione o rimozione del fattore di crescita includono misurazione standard in tessuto e/o in fluidi (ad es. siero o sangue) quali Western blot, saggio di immunoassorbente legato ad un enzima (ELISA), saggi di attività, saggi reporter, saggi mediante luciferasi, arrays di reazione a catena della polimerasi (PCR), arrays di geni, trascrittasi inversa (RT) PCR in tempo reale e simili.

Anticorpi della presente invenzione possono legare o interagire con qualunque numero di epitopi su o lungo i GPC o loro strutture associate per accrescere o inibire la segnalazione del fattore di crescita. Tali epitopi possono includere qualsiasi e tutti i possibili siti per modificare, accrescere o inibire la funzione di GPC. In alcune forme di realizzazione, tali epitopi includono, ma non sono limitati a epitopi su o all'interno di fattori di crescita, elementi regolatori, GPC, fattori modulatori GPC, cellule riceventi fattore di crescita o recettori, LAP o domini LAP-simili, regioni gancio, siti di clivaggio per furina, regioni braccio, regioni dita, domini di legame di LTBP, domini di legame di fibrillina, domini di legame di ripetizioni predominanti della glicoproteina A (GARP), lazi di latenza, regioni alfa 1, sequenze RGD, regioni cravatta a farfalla, componenti della matrice extracellulare e/o matrice cellulare e/o epitopi formati combinando regioni o porzioni di qualunque dei precedenti.

Composti e/o composizioni della presente invenzione esercitano i loro effetti attraverso legame (reversibile o irreversibile) a uno o più epitopi e/o regioni di riconoscimento anticorpale. Pur non volendo essere vincolati da una teoria, tali siti di legame per gli anticorpi, sono il più spesso formati da proteine, domini o regioni proteiche. I siti di legame possono, tuttavia, includere biomolecole quali zuccheri, lipidi, molecole di acido nucleico o qualunque altra forma di epitopo legante.

In alcune forme di realizzazione, anticorpi antagonisti della presente invenzione possono legarsi a prodomini di TGF- $\beta$ , stabilizzando e impedendo il rilascio mediato da integrina, ad esempio, bloccando il sito RGD o stabilizzando la struttura. Tali anticorpi sarebbero utili nel trattamento della malattia di Camurati-Engelmann, in cui mutazioni nel prodominio causano eccessiva attivazione del TGF- $\beta$ . Tali anticorpi sarebbero anche utili nella sindrome di Marfan, in cui mutazioni nelle fibrilline o nelle LTBP modificano l'attivazione di TGF- $\beta$  e BMP.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione inibiscono selettivamente il rilascio di TGF- $\beta$  dai GPC associati con le LTBP ma non quelli associati con GARP. Tali anticorpi funzionano come prodotti terapeutici anti-fibrotici ma esibiscono effetti infiammatori minimi. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi leganti il complesso GPC-LTBP non si legano ai complessi GPC-GARP. In alcune forme di realizzazione, tali anticorpi, possono non essere specifici per un particolare LTBP o GPC, ma possono legarsi ai GPC vicino o in sovrapposizione ai siti di legame per GARP, in modo tale che il legame sia impedito da GARP, ma non dalle LTBP. In alcune forme di realizzazione, sono forniti anticorpi che legano selettivamente uno o più epitopi combinatori tra GARP e proTGF- $\beta$ . In alcune forme di realizzazione della presente invenzione, sono forniti composti e/o composizioni che inducono rilascio di TGF- $\beta$  da complessi GARP-proTGF- $\beta$ . Tali anticorpi possono essere selezionati per la loro capacità di legarsi a complessi binari GARP prodominio ma non a complessi ternari GARP-proTGF- $\beta$ , alle sole GARP, o ai soli prodomini.

In alternativa o in aggiunta, anticorpi della presente invenzione possono funzionare come mimetici del ligando che indurrebbero l'internalizzazione dei GPC. Tali anticorpi possono agire come carriers di carico utile non tradizionali, agendo per veicolare e/o trasportare a specifici GPC e/o siti correlati a GPC carichi utili farmaceutici legati o coniugati.

Variazioni suscitate dagli anticorpi della presente invenzione possono dare come risultato variazioni neomorfe nella cellula. Come usato nella presente, il termine " variazione neomorfica" si riferisce a una variazione o una modificazione che è nuova o diversa. Ad esempio, un anticorpo che suscita il rilascio o la stabilizzazione di uno o più fattori di crescita tipicamente non associati a un particolare GPC mirato dall'anticorpo, sarebbe un anticorpo neomorfo e il rilascio sarebbe una variazione neomorfica.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono agire per modificare e/o controllare eventi proteolitici. In alcune forme di realizzazione, tali eventi proteolitici possono essere intracellulari o extracellulari. In alcune forme di realizzazione, tali eventi proteolitici possono includere la modificazione di clivaggio mediante furina e/o altri eventi di processamento proteolitico. In alcune forme di realizzazione, tali eventi proteolitici possono comprendere processamento proteolitico di molecole di segnalazione

del fattore di crescita o cascate a valle iniziate dalle molecole di segnalazione del fattore di crescita.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono indurre o inibire la dimerizzazione o la multimerizzazione di fattori di crescita (ligandi) o loro recettori. In alcune forme di realizzazione, tali azioni possono essere attraverso la stabilizzazione di forme monomeriche, dimeriche o multimeriche o attraverso il perturbamento di complessi dimerici o multimerici.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono agire su omo e/o eterodimeri delle unità monomeriche comprendenti gruppi di recettori o GPC o altre coppie di molecole di segnalazione.

Anticorpi della presente invenzione possono essere internalizzati nelle cellule prima di legarsi agli antigeni bersaglio. In seguito all'internalizzazione, tali anticorpi possono agire per aumentare o diminuire uno o più eventi di segnalazione, rilasciare o stabilizzare uno o più GPC, bloccare o facilitare il rilascio del fattore di crescita e/o modificare una o più nicchie cellulari.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono anche modificare il tempo di residenza di uno o più fattori di crescita in uno o più GPC e/o modificare il tempo di residenza di uno o più GPC nella matrice extracellulare e/o nella matrice cellulare. Tali modificazioni possono dare come risultato una localizzazione irreversibile e/o una localizzazione transitoria.

Gli anticorpi della presente invenzione possono essere progettati, prodotti e/o selezionati utilizzando qualunque metodo noto a uno di esperienza nella tecnica. In alcune forme di realizzazione, anticorpi e/o cellule produttori anticorpi della presente invenzione sono prodotti/e secondo qualunque dei metodi elencati nelle Domande di Brevetto Provvisorie degli Stati Uniti 61/722,919, depositata il 6 Novembre 2012 e 61/722,969, depositata il 6 Novembre 2012.

#### *Generazione di anticorpi in topi knockout*

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere generati in topi knockout che mancano di un gene codificante per uno o più antigeni desiderati. Tali topi non sarebbero tolleranti per tali antigeni e perciò possono essere in grado di generare anticorpi contro di loro che potrebbero cross-reagire con

forme umane e murine dell'antigene. Per la produzione di anticorpi monoclonali, i topi ospiti vengono immunizzati con il peptide bersaglio per suscitare linfociti che si legano specificamente a quel peptide. I linfociti vengono raccolti e fusi con una linea cellulare immortalizzata. Le cellule di ibridoma risultanti vengono coltivate in un terreno di coltura adatto con un agente di selezione per supportare la crescita delle sole cellule fuse.

In alcune forme di realizzazione, lo knocking out di uno o più geni di fattore di crescita può essere letale e/o produrre un feto o un neonato che è non vitale. In alcune forme di realizzazione, gli animali neonati possono sopravvivere solo per poche settimane (ad esempio 1, 2, 3, 4 o 5 settimane). In tali forme di realizzazione, le immunizzazioni possono essere effettuate in animali neonati appena dopo la nascita. Oida et al (Oida, T. et al., TGF- $\beta$  induces surface LAP expression on Murine CD4 T cells independent of FoxP3 induction. PLOS One. 2010. 5(11):e15523) dimostrano che l'immunizzazione di topi knockout per TGF- $\beta$  neonati attraverso l'uso di iniezioni di galectina-1 prolunga la sopravvivenza (tipicamente 3-4 settimane dopo la nascita in questi topi). I topi sono stati immunizzati con cellule esponenti TGF- $\beta$  murino a giorni alterni per 10 giorni iniziando dall'ottavo giorno dopo la nascita e gli splenociti sono stati raccolti nel giorno 22 dopo la nascita. Gli splenociti raccolti sono stati fusi con cellule di mieloma e delle cellule di ibridoma risultanti, è stato trovato che molte producono con successo anticorpi anti-LAP. In alcune forme di realizzazione della presente invenzione, questi metodi possono essere usati per generare anticorpi. In alcune forme di realizzazione, tali metodi possono comprendere l'uso di antigeni umani. In alcune forme di realizzazione, cellule usate per l'immunizzazione possono esprimere TGF- $\beta$  e GARP. In tali forme di realizzazione, GARP possono essere espresse con domini transmembrana nativi per consentire ai complessi GARP-TGF- $\beta$  di rimanere legati alla superficie cellulare delle cellule trasfettate usate dall'immunizzazione. Alcuni antigeni possono comprendere proTGF- $\beta$ 1 legato a LTBP (ad es. LTBP1S.) In alcuni casi, proteine ricombinanti correlate a altri membri della famiglia del TGF- $\beta$  possono essere usate come antigeni.

Metodi della presente invenzione possono anche comprendere uno o più passi dei metodi di immunizzazione descritti da Oida et al combinati con uno o più passi aggiuntivi e/o modificati. I passi modificati possono includere, ma non sono limitati all'uso di tipi cellulari alternativi per le fusioni, all'unione in pool di un numero variabile di splenociti quando si compiono le fusioni, alla modifica del regime delle iniezioni, alla modifica della data di

raccolta degli splenociti, alla modifica dell'immunogeno e/o alla modifica della dose di immunogeno. Passi aggiuntivi possono includere la raccolta di altri tessuti (ad esempio linfonodi) dai topi immunizzati.

*Anticorpi di attivazione e di inibizione*

Gli anticorpi della presente invenzione possono comprendere anticorpi di attivazione o di inibizione. Come usato nella presente, il termine "anticorpo di attivazione" si riferisce a un anticorpo che promuove l'attività del fattore di crescita. Gli anticorpi di attivazione includono anticorpi che prendono di mira qualunque epitopo che promuove l'attività del fattore di crescita. Tali epitopi possono trovarsi su prodomini (ad es. LAP e domini LAP-simili,) fattori di crescita o altri epitopi che quando legati dall'anticorpo, portano all'attività del fattore di crescita.

Come usato nella presente, il termine "anticorpo di inibizione" si riferisce a un anticorpo che riduce l'attività del fattore di crescita. Gli anticorpi di inibizione includono anticorpi che prendono di mira qualunque epitopo che riduce l'attività del fattore di crescita quando associato con tali anticorpi. Tali epitopi possono trovarsi su prodomini (ad esempio LAP e domini LAP-simili,) fattori di crescita o altri epitopi che portano a ridotta attività del fattore di crescita quando legati dall'anticorpo.

Forme di realizzazione della presente invenzione includono metodi di uso di anticorpi di attivazione e/o inibizione in soluzione, in coltura cellulare e/o in soggetti per modificare la segnalazione del fattore di crescita.

*Anticorpi anti-LAP e anti-dominio LAP-simile*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono comprendere uno o più anticorpi che prendono di mira un prodominio, includente LAP e/o domini LAP-simili. Tali anticorpi possono ridurre o aumentare la segnalazione del fattore di crescita a seconda dello specifico LAP o dominio LAP-simile che viene legato e/o a seconda dello specifico epitopo mirato da tali anticorpi. Anticorpi anti-LAP e/o anti- proteina LAP-simile dell'invenzione possono promuovere la dissociazione di fattori di crescita liberi dai GPC. Tale dissociazione può essere indotta al momento del legame dell'anticorpo a un GPC o la dissociazione può essere promossa impedendo la ri-associazione di fattore di crescita libero con LAP o proteina LAP-simile. In alcuni casi, sono forniti anticorpi anti-TGF- $\beta$  LAP. Anticorpi anti-TGF- $\beta$  LAP possono comprendere anticorpi di attivazione di TGF- $\beta$ . Tali anticorpi possono aumentare l'attività di TGF- $\beta$ , in alcuni casi attraverso rilascio del fattore di

crescita TGF- $\beta$  libero da GPC latenti e/o impedendo la ri-associazione del fattore di crescita TGF- $\beta$  libero con LAP. In alcuni casi, anticorpi anti-TGF- $\beta$  LAP possono aumentare l'attività di TGF- $\beta$  più favorevolmente quando proTGF- $\beta$  è associato con LTBP. In alcuni casi, anticorpi anti-TGF- $\beta$  LAP possono aumentare l'attività di TGF- $\beta$  più favorevolmente quando proTGF- $\beta$  è associato con GARP. In alcuni casi, anticorpi anti-TGF- $\beta$  LAP possono funzionare sinergicamente con altri attivatori di TGF- $\beta$  (ad es.  $\alpha v\beta_6$  e/o  $\alpha v\beta_8$ ) per aumentare l'attività di TGF- $\beta$ .

#### *Variazioni*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono esistere come un polipeptide intero, una pluralità di polipeptidi o frammenti di polipeptidi, che possono essere codificati indipendentemente da uno o più acidi nucleici, una pluralità di acidi nucleici, frammenti di acidi nucleici o varianti di qualunque dei suddetti. Come usato nella presente, il termine "polipeptide" si riferisce a un polimero di residui amminoacidici (naturali o non naturali) legati insieme il più spesso tramite legami peptidici. Il termine, come usato nella presente, si riferisce a proteine, polipeptidi, e peptidi di qualunque dimensione, struttura, o funzione. In alcuni casi il polipeptide codificato è più piccolo di circa 50 amminoacidi e il polipeptide viene quindi detto un peptide. Se il polipeptide è un peptide, sarà lungo almeno circa 2, 3, 4, o almeno 5 residui amminoacidici. Pertanto, i polipeptidi includono prodotti genici, polipeptidi esistenti in natura, polipeptidi sintetici, omologhi, ortologhi, paraloghi, frammenti ed altri equivalenti, varianti, e analoghi dei precedenti. Un polipeptide può essere una singola molecola o può essere un complesso multi-molecolare quale un dimero, un trimero o un tetramero. Essi possono anche comprendere polipeptidi a singola catena o a più catene e possono essere associati o legati. Il termine polipeptide può anche applicarsi a polimeri di amminoacidi in cui uno o più residui amminoacidici sono un analogo chimico artificiale di un corrispondente amminoacido esistente in natura.

Come usato nella presente, il termine "variante di polipeptide" si riferisce a molecole che differiscono nella loro sequenza amminoacidica da una sequenza nativa o di riferimento. Le varianti di sequenza amminoacidica possono avere sostituzioni, delezioni, e/o inserzioni in certe posizioni all'interno della sequenza amminoacidica, rispetto a una sequenza nativa o di riferimento. Di solito, le varianti avranno almeno circa 50% di identità (omologia) con una sequenza nativa o di riferimento, e preferibilmente, saranno almeno circa 80%, più preferibilmente almeno

circa 90% identiche (omologhe) a una sequenza nativa o di riferimento.

In alcune forme di realizzazione sono forniti "mimici varianti". Come usato nella presente, il termine "mimici varianti" si riferisce a una variante che contiene uno o più amminoacidi che mimerebbero una sequenza attivata. Ad esempio, glutammato può servire come un mimico per fosfo-treonina e/o fosfo-serina. In alternativa, i mimici varianti possono dare come risultato disattivazione o un prodotto inattivato contenente il mimico, ad es., la fenilalanina può agire come una sostituzione inattivante per la tirosina; o alanina può agire come una sostituzione inattivante per la serina. Le sequenze amminoacidiche dei composti e/o delle composizioni dell'invenzione possono comprendere amminoacidi esistenti in natura e come tali si può considerare che sono proteine, peptidi, polipeptidi, o frammenti delle stesse. In alternativa, i composti e/o le composizioni possono comprendere amminoacidi sia naturali che non naturali.

Come usato nella presente, il termine "variante di sequenza amminoacidica" si riferisce a molecole con alcune differenze nelle loro sequenze amminoacidiche rispetto a una sequenza nativa o di partenza. Le varianti di sequenza amminoacidica possono possedere sostituzioni, delezioni, e/o inserzioni in certe posizioni all'interno della sequenza amminoacidica. Come usato nella presente, i termini "nativa" o "di partenza" quando si fa riferimento alle sequenze sono termini relativi che si riferiscono a una molecola originaria verso la quale può essere fatto un confronto. Sequenze native o di partenza non devono essere confuse con le sequenze wild-type. Sequenze o molecole native possono rappresentare la sequenza wild-type (quella sequenza trovata in natura) ma non è necessario che siano identiche alla sequenza wild-type.

Di solito, le varianti avranno almeno circa il 70% di omologia con una sequenza nativa, e preferibilmente, saranno almeno circa l'80%, più preferibilmente almeno circa il 90% omologhe a una sequenza nativa.

Come usato nella presente, il termine "omologia" quando si applica alle sequenze amminoacidiche è definito come la percentuale di residui nella sequenza amminoacidica candidata che sono identici ai residui nella sequenza amminoacidica di una seconda sequenza dopo allineamento delle sequenze e introduzione di gap, se necessario, per ottenere la massima percentuale di omologia. Metodi e programmi informatici per l'allineamento sono ben noti nella tecnica. Resta inteso che l'omologia dipende da un calcolo di percentuale di identità ma può differire nel

valore per via dei gap e delle penalità introdotte nel calcolo.

Come usato nella presente, il termine "omologo" quando si applica alle sequenze amminoacidiche significa la sequenza corrispondente di un'altra specie avente una sostanziale identità con una seconda sequenza di una seconda specie.

Come usato nella presente, il termine "analogo" si intende che include varianti di polipeptide che differiscono di una o più variazioni amminoacidiche, ad es., sostituzioni, addizioni o delezioni di residui amminoacidici che ancora mantengono le proprietà del polipeptide parentale.

Come usato nella presente, il termine "derivato" è usato in senso di sinonimo con il termine "variante" e si riferisce a una molecola che è stata modificata o cambiata in qualche modo rispetto a una molecola di riferimento o una molecola di partenza.

La presente invenzione contempla diversi tipi di composti e/o composizioni che sono basati su amminoacidi includenti varianti e derivati. Questi includono varianti e derivati di sostituzione, inserzione, delezione e covalenti.

Come tali, inclusi nell'ambito della presente invenzione sono composti e/o composizioni comprendenti sostituzioni, inserzioni, addizioni, delezioni e/o modificazioni covalenti. Ad esempio, tag di sequenza o amminoacidi, quali una o più lisine, possono essere aggiunti alle sequenze peptidiche dell'invenzione (ad es., alle estremità N-terminali o C-terminali). Tag di sequenza possono essere usati per la purificazione o la localizzazione dei peptidi. Le lisine possono essere usate per aumentare la solubilità dei peptidi o per consentire la biotinilazione. In alternativa, residui amminoacidici localizzati nelle regioni carbossi e ammino terminali della sequenza amminoacidica di un peptide o una proteina possono facoltativamente essere deleti fornendo sequenze troncate. Certi amminoacidi (ad es., residui C-terminali o N-terminali) possono in alternativa essere deleti a seconda dell'uso della sequenza, come ad esempio, espressione della sequenza come parte di una sequenza più grande che è solubile, o legata a un supporto solido.

"Varianti di sostituzione" quando si fa riferimento alle proteine sono quelle che hanno almeno un residuo amminoacidico in una sequenza nativa o di partenza rimosso e un amminoacido diverso inserito al suo posto nella stessa posizione. Le sostituzioni possono essere singole, dove soltanto un amminoacido nella molecola è stato

sostituito, o possono essere multiple, dove due o più amminoacidi sono stati sostituiti nella stessa molecola.

Come usato nella presente, il termine "sostituzione amminoacidica conservativa" si riferisce alla sostituzione di un amminoacido che è normalmente presente nella sequenza con un amminoacido diverso di simile dimensione, carica, o polarità. Esempi di sostituzioni conservative includono la sostituzione di un residuo non polare (idrofobo) quale isoleucina, valina e leucina a un altro residuo non polare. Similmente, esempi di sostituzioni conservative includono la sostituzione di un residuo polare (idrofilo) a un altro quale tra arginina e lisina, tra glutammina e asparagina, e tra glicina e serina. Inoltre, la sostituzione di un residuo basico quale lisina, arginina o istidina a un altro, o la sostituzione di un residuo acido quale acido aspartico o acido glutammico a un altro residuo acido sono ulteriori esempi di sostituzioni conservative. Esempi di sostituzioni non conservative includono la sostituzione di un residuo amminoacidico non polare (idrofobo) quale isoleucina, valina, leucina, alanina, metionina a un residuo polare (idrofilo) quale cisteina, glutammina, acido glutammico o lisina e/o di un residuo polare a un residuo non polare.

Come usato nella presente, il termine "varianti di inserzione" quando si fa riferimento alle proteine sono quelle con uno o più amminoacidi inseriti immediatamente adiacenti a un amminoacido in una particolare posizione in una sequenza nativa o di partenza. Come usato nella presente, il termine "immediatamente adiacenti" si riferisce a un amminoacido adiacente che è connesso al gruppo funzionale alfa-carbossi o alfa-ammino di un amminoacido di partenza o di riferimento.

Come usato nella presente, il termine "varianti di delezione" quando si fa riferimento alle proteine, sono quelle con uno o più amminoacidi nella sequenza amminoacidica nativa o di partenza rimossi. Di solito, le varianti di delezione avranno uno o più amminoacidi deleti in una particolare regione della molecola.

Come usato nella presente, il termine "derivati", come riferito nella presente include varianti di una proteina nativa o di partenza comprendenti una o più modificazioni con agenti di derivatizzazione proteici o non proteici organici, e modificazioni post-traduzionali. Modificazioni covalenti vengono tradizionalmente introdotte facendo reagire residui amminoacidici mirati della proteina con un agente di derivatizzazione organico che è in grado di reagire con catene laterali selezionate o con residui terminali, o sfruttando meccanismi di modificazioni post-traduzionali

che funzionano in cellule ospiti ricombinanti selezionate. I derivati covalenti risultanti sono utili in programmi diretti all'identificazione di residui importanti per l'attività biologica, per immunosaggi, o per la preparazione di anticorpi anti-proteina per la purificazione per immunoaffinità della glicoproteina ricombinante. Tali modificazioni rientrano nell'ordinaria esperienza nella tecnica e sono compiute senza eccessiva sperimentazione. Certe modificazioni post-traduzionali sono il risultato dell'azione delle cellule ospiti ricombinanti sul polipeptide espresso. I residui glutaminile e asparaginile vengono spesso deamidati a livello post-traduzionale nei corrispondenti residui glutaminile e aspartile. In alternativa, questi residui vengono deamidati in condizioni debolmente acide. Ambedue le forme di questi residui possono essere presenti nelle proteine usate in accordo con la presente invenzione.

Altre modificazioni post-traduzionali includono idrossilazione di prolina e lisina, fosforilazione di gruppi idrossile di residui serile o treonile, metilazione dei gruppi alfa-ammino di catene laterali di lisina, arginina, e istidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)).

I derivati covalenti includono specificamente molecole di fusione in cui le proteine dell'invenzione sono covalentemente legate a un polimero non proteico. Il polimero non proteico di solito è un polimero sintetico idrofilo, cioè un polimero altrimenti non trovato in natura. Tuttavia, sono utili polimeri che esistono in natura e sono prodotti tramite metodi ricombinanti o *in vitro*, come lo sono polimeri che sono isolati dalla natura. Polimeri polivinilici idrofili rientrano nell'ambito della presente invenzione, ad esempio alcol polivinilico e polivinilpirrolidone. Particolarmente utili sono polivinilalchilene eteri quale un polietilenglicole, un polipropilenglicole. Le proteine possono essere legate a vari polimeri non proteici, quali polietilenglicole, polipropilenglicole o poliossialchilene, nel modo esposto in Brevetto U.S. No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337.

Come usato nella presente, il termine "caratteristiche" quando si fa riferimento alle proteine è definito come componenti distinti basati sulla sequenza amminoacidica di una molecola. Caratteristiche delle proteine della presente invenzione includono manifestazioni di superficie, forma conformazionale locale, ripiegamenti, loop,

metà-loop, domini, metà-domini, siti, terminali o qualunque combinazione degli stessi.

Come usato nella presente, il termine "manifestazione di superficie" quando si fa riferimento alle proteine si riferisce a un componente a base polipeptidica di una proteina che compare su una superficie più esterna.

Come usato nella presente, il termine "forma conformazionale locale" quando si fa riferimento alle proteine si riferisce a una manifestazione strutturale a base polipeptidica di una proteina che si trova in uno spazio definibile della proteina.

Come usato nella presente, il termine "ripiegamento", quando si fa riferimento alle proteine, si riferisce alla conformazione risultante di una sequenza amminoacidica su minimizzazione energetica. Un ripiegamento può verificarsi a livello secondario o terziario del processo di ripiegamento. Esempi di ripiegamenti a livello secondario includono foglietti beta e alfa eliche. Esempi di ripiegamenti terziari includono domini e regioni formati per via di aggregazione o separazione di forze energetiche. Regioni formate in questo modo includono tasche idrofobiche e idrofiliche, e simili.

Come usato nella presente, il termine "giro" quando riguarda la conformazione delle proteine, si riferisce a una curva che modifica la direzione della catena principale di un peptide o un polipeptide e può implicare uno, due, tre o più residui amminoacidici.

Come usato nella presente, il termine "loop", quando si fa riferimento alle proteine, si riferisce a una caratteristica strutturale di un peptide o un polipeptide che inverte la direzione della catena principale di un peptide o un polipeptide e comprende quattro o più residui amminoacidici. Oliva et al. hanno identificato almeno 5 classi di loop delle proteine (Oliva, B. et al., An automated classification of the structure of protein loops. *J Mol Biol.* 1997. 266(4):814-30.)

Come usato nella presente, il termine "metà-loop", quando si fa riferimento alle proteine, si riferisce a una porzione di un loop identificato avente almeno la metà del numero di amminoacidi che si trova nel loop da cui è derivato. Resta inteso che è possibile che i loop non sempre contengono un numero pari di residui amminoacidici. Perciò, in quei casi dove un loop contiene o è identificato che comprende un numero dispari di amminoacidi, una metà-loop del loop di numero dispari comprenderà la porzione di numero intero o la porzione di numero intero

successivo del loop (numero di amminoacidi del loop/2+/-0.5 amminoacidi). Ad esempio, un loop identificato come un loop di 7 amminoacidi potrebbe produrre metà-loop di 3 amminoacidi o 4 amminoacidi ( $7/2=3.5\pm 0.5$  essendo 3 o 4).

Come usato nella presente, il termine "dominio", quando si fa riferimento alle proteine, si riferisce a un motivo di un polipeptide avente una o più caratteristiche o proprietà strutturali o funzionali identificabili (ad es., capacità di legame, servendo come un sito per interazioni proteina-proteina.)

Come usato nella presente, il termine "metà-dominio," quando si fa riferimento alle proteine, si riferisce a una porzione di un dominio identificato avente almeno la metà del numero di amminoacidi che si trova nel dominio da cui è derivato. Resta inteso che è possibile che i domini non sempre contengono un numero pari di residui amminoacidici. Perciò, in quei casi dove un dominio contiene o è identificato comprendere un numero dispari di amminoacidi, una metà-dominio del dominio dispari comprenderà la porzione di numero intero o la porzione di numero intero successivo del dominio (numero di amminoacidi del dominio/2+/-0.5 amminoacidi). Ad esempio, un dominio identificato come un dominio di 7 amminoacidi potrebbe produrre metà-domini di 3 amminoacidi o 4 amminoacidi ( $7/2=3.5\pm 0.5$  essendo 3 o 4). Resta anche inteso che sotto-domini possono essere identificati all'interno dei domini o metà-domini, questi sottodomini possedendo meno di tutte le proprietà strutturali o funzionali identificate nei domini o nei metà-domini da cui sono stati derivati. Resta anche inteso che non è necessario che gli amminoacidi, che qualsiasi tipo di dominio nella presente comprende, siano contigui lungo la catena principale del polipeptide (cioè, amminoacidi non adiacenti possono ripiegarsi strutturalmente per produrre un dominio, una metà-dominio o un sottodominio).

Come usato nella presente, i termini "sito", quando si riferisce a forme di realizzazione a base di amminoacidi sono usati come sinonimi con "residuo amminoacidico" e "catena laterale di amminoacido". Un sito rappresenta una posizione all'interno di un peptide o un polipeptide che può essere modificato, manipolato, modificato, derivatizzato o variato all'interno delle molecole a base di polipeptide della presente invenzione.

Come usato nella presente, i termini "terminali" o "terminale," quando si fa riferimento alle proteine si riferisce a un'estremità di un peptide o un polipeptide. Tale estremità non è limitata solo al primo o all'ultimo sito del peptide

o del polipeptide ma può includere amminoacidi aggiuntivi nelle regioni terminali. Le molecole a base di polipeptide della presente invenzione possono essere caratterizzate come aventi sia un N-terminale (terminate da un amminoacido con un gruppo amminico (NH<sub>2</sub>) libero) sia un C-terminale (terminate da un amminoacido con un gruppo carbossile (COOH) libero). Le proteine dell'invenzione sono in alcuni casi costituite da più catene polipeptidiche unite da legami disolfuro o da forze non covalenti (multimeri, oligomeri). Questi tipi di proteine avranno molteplici N- e C-terminali. In alternativa, i terminali dei polipeptidi possono essere modificati in modo da iniziare o terminare, come il caso può essere, con una porzione a base non di polipeptide quale un coniugato organico.

Una volta che qualunque delle caratteristiche è stata identificata o definita come un componente di una molecola dell'invenzione, qualunque di diverse manipolazioni e/o modificazioni di queste caratteristiche può essere compiuta muovendo, scambiando, invertendo, attuando una delezione, randomizzando o duplicando. Inoltre, resta inteso che una manipolazione delle caratteristiche può comportare lo stesso esito di una modificazione alle molecole dell'invenzione. Ad esempio, una manipolazione che ha implicato la delezione di un dominio comporterebbe la modificazione della lunghezza di una molecola proprio come farebbe la modificazione di un acido nucleico per codificare meno di una molecola a lunghezza intera.

Modificazioni e manipolazioni possono essere realizzate tramite metodi noti nella tecnica quale la mutagenesi sito-diretta. Le molecole modificate risultanti possono poi essere testate per l'attività utilizzando saggi in vitro o in vivo quali quelli descritti nella presente o qualunque altro saggio di screening adatto noto nella tecnica.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono comprendere uno o più atomi che sono isotopi. Come usato nella presente, il termine "isotopo" si riferisce a un elemento chimico che ha uno o più neutroni aggiuntivi. In alcune forme di realizzazione, composti della presente invenzione possono essere deuterati. Come usato nella presente, il termine "deuterato" si riferisce al processo di sostituzione di uno o più atomi di idrogeno in una sostanza con isotopi deuterio. Gli isotopi deuterio sono isotopi dell'idrogeno. Il nucleo di idrogeno contiene un protone mentre i nuclei di deuterio contengono sia un protone che un neutrone. I composti e/o le composizioni della presente invenzione possono essere deuterati al fine di variare una o più proprietà fisiche,

quale la stabilità, o permettere l'uso di composti e/o composizioni in applicazioni diagnostiche e/o sperimentali.

#### *Coniugati e Combinazioni*

È contemplato dalla presente invenzione che i composti e/o le composizioni della presente invenzione possano essere complessati, coniugati o combinati con una o più molecole omologhe o eterologhe. Come usato nella presente, il termine "molecola omologa" si riferisce a una molecola che è simile in almeno una di struttura o funzione rispetto a una molecola di partenza mentre una "molecola eterologa" è una che differisce in almeno una di struttura o funzione rispetto a una molecola di partenza. Gli omologhi strutturali sono quindi molecole che possono essere sostanzialmente simili a livello di struttura. In alcune forme di realizzazione, tali omologhi possono essere identici. Gli omologhi funzionali sono molecole che possono essere sostanzialmente simili a livello di funzione. In alcune forme di realizzazione, tali omologhi possono essere identici.

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono comprendere coniugati. Tali coniugati dell'invenzione possono includere sostanze o ligandi esistenti in natura, quali proteine (ad esempio, albumina sierica umana (HSA), lipoproteina a bassa densità (LDL), lipoproteina ad alta densità (HDL), o globulina); carboidrati (ad esempio, un destrano, un pullulano, una chitina, un chitosano, un'inulina, una ciclodestrina o acido ialuronico); o lipidi. I coniugati possono anche essere molecole ricombinanti o sintetiche, quali polimeri sintetici, ad esempio, poliamminoacidi sintetici, un oligonucleotide (ad es. un aptamero). Esempi di poliamminoacidi possono includere polilisina (PLL), poli acido L-aspartico, poli acido L-glutammico, copolimero stirene-anidride dell'acido maleico, copolimero poli(L-lattide-co-glicolide), copolimero divinil etere-anidride maleica, copolimero N-(2-idrossipropil)metacrilammide (HMPA), polietilenglicole (PEG), alcol polivinilico (PVA), poliuretano, poli(acido 2-etilacrilico), polimeri N-isopropilacrilamidici, o polifosfazina. Esempio di poliammine includono: polietilenimina, polilisina (PLL), spermina, spermidina, poliammina, pseudopeptide-poliammina, peptidomimetico poliammina, dendrimero poliammina, arginina, ammidina, protammina, lipide cationico, porfirina cationica, sale quaternario di una poliammina, o un peptide alfa elicoidale.

In alcune forme di realizzazione, i coniugati possono anche includere gruppi direzionanti. Come usato nella presente, il termine "gruppo direzionante" si riferisce a un gruppo o una porzione funzionale attaccato/a a un agente

che facilita la localizzazione dell'agente in una regione, un tessuto, una cellula e/o una proteina desiderati. Tali gruppi direzionanti possono includere, ma non sono limitati a agenti o gruppi che mirano a cellule o tessuti (ad es. lectine, glicoproteine, lipidi, proteine, un anticorpo che si lega a uno specificato tipo cellulare quale una cellula renale o un altro tipo cellulare). In alcune forme di realizzazione, i gruppi direzionanti possono comprendere tirotropine, melanotropine, lectine, glicoproteine, proteina del surfattante A, carboidrati della mucina, lattosio multivalente, galattosio multivalente, N-acetil-galattosammina, N-acetil-glucosammina, mannosio multivalente, fucosio multivalente, poliamminoacidi glicosilati, galattosio multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, lipidi, colesterolo, steroidi, acidi biliari, folati, vitamina B12, biotina, un peptide RGD, un mimetico di peptide RGD o un aptamero.

In alcune forme di realizzazione, gruppi direzionanti possono essere proteine, ad es., glicoproteine, o peptidi, ad esempio, molecole aventi una specifica affinità per un co-ligando, o anticorpi ad es., un anticorpo, che si lega a uno specificato tipo cellulare quale una cellula cancerosa, una cellula endoteliale, o una cellula dell'osso. I gruppi direzionanti possono anche comprendere ormoni e/o recettori ormonali.

In alcune forme di realizzazione, i gruppi direzionanti possono essere qualunque ligando capace di mirare a specifici recettori. Esempi includono, senza limitazione, folato, GalNAc, galattosio, mannosio, mannosio-6-fosfato, aptameri, ligandi dei recettori integrinici, ligandi dei recettori per le chemochine, transferrina, biotina, ligandi dei recettori per la serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, LDL, e HDL ligandi. In alcune forme di realizzazione, i gruppi direzionanti sono aptameri. Tali aptameri possono essere non modificati o comprendere qualunque combinazione di modificazioni descritte nella presente.

In ancora altre forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere coniugati covalentemente a polipeptidi penetranti nelle cellule. In alcune forme di realizzazione, i peptidi penetranti nelle cellule possono anche includere sequenze segnale. In alcune forme di realizzazione, i coniugati dell'invenzione possono essere progettati per avere stabilità aumentata, trasfezione delle cellule aumentata e/o biodistribuzione modificata (ad es., mirati a specifici tessuti o tipi cellulari.)

In alcune forme di realizzazione, porzioni di coniugazione possono essere aggiunte a composti e/o composizioni

della presente invenzione in modo da consentire l'attacco di marcatori rivelabili ai target per la clearance. Tali marcatori rivelabili includono, ma non sono limitati a marcatori biotina, ubiquitine, molecole fluorescenti, emoagglutinina (HA) dell'influenza umana, c-myc, istidina (His), flag, glutatione S-transferasi (GST), V5 (un epitopo di paramixovirus virus di scimmia 5), biotina, avidina, streptavidina, perossidasi di rafano (HRP) e digossigenina.

In alcune forme di realizzazione, i composti dell'invenzione possono essere coniugati con un dominio Fc di anticorpo per creare una proteina di fusione all'Fc. La formazione di una proteina di fusione all'Fc con qualunque dei composti descritti nella presente può essere effettuata secondo qualunque metodo noto nella tecnica, incluso come descritto nei Brevetti degli Stati Uniti No. 5,116,964, 5,541,087 e 8,637,637. Le proteine di fusione all'Fc dell'invenzione possono comprendere un composto dell'invenzione legato alla regione cerniera di un Fc di IgG attraverso residui di cisteina nella regione cerniera dell'Fc. Le proteine di fusione all'Fc risultanti possono comprendere una struttura anticorpo-simile, ma senza domini C<sub>H1</sub> o catene leggere. In alcuni casi, le proteine di fusione all'Fc possono comprendere profili farmacocinetici paragonabili agli anticorpi nativi. In alcuni casi, proteine di fusione all'Fc dell'invenzione possono comprendere emivita in circolazione estesa e/o attività biologica modificata.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere combinati con un'altra o altre molecole nel trattamento di malattie e/o condizioni.

#### *Acidi nucleici*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere codificati da molecole di acido nucleico. Tali molecole di acido nucleico includono, senza limitazione, molecole di DNA, molecole di RNA, polinucleotidi, oligonucleotidi, molecole di mRNA, vettori, plasmidi e simili. In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione può comprendere cellule programmate o generate per esprimere molecole di acido nucleico codificanti per composti e/o composizioni della presente invenzione.

#### *Metodi di uso*

Metodi della presente descrizione includono metodi di modificazione di attività di un fattore di crescita in uno o

più sistemi biologici. Tali metodi possono includere mettere a contatto uno o più sistemi biologici con un composto e/o una composizione dell'invenzione. In alcuni casi, questi metodi includono modificare il livello di fattore di crescita libero in un sistema biologico (ad es. in una nicchia cellulare o in un soggetto.) Composti e/o composizioni secondo tali metodi possono includere, ma non sono limitati a biomolecole, includenti, ma non limitate a proteine ricombinanti, complessi di proteine e/o anticorpi descritti nella presente.

In alcune forme di realizzazione, metodi della presente descrizione possono essere usati per avviare o aumentare l'attività del fattore di crescita, chiamati nella presente "metodi di attivazione". Alcuni tali metodi possono comprendere il rilascio del fattore di crescita da un GPC e/o l'inibizione della ri-associazione del fattore di crescita in un GPC latente. In alcuni casi, i metodi di attivazione possono comprendere l'uso di un anticorpo, una proteina ricombinante e/o un complesso di proteine. Secondo alcuni metodi di attivazione, sono forniti uno o più anticorpi di attivazione. In tali metodi, uno o più fattori di crescita possono essere rilasciati o impediti dall'essere trascinati di nuovo in un GPC. In un esempio non limitante, può essere fornito un anticorpo anti-LAP che accresce la dissociazione tra un fattore di crescita e un GPC e/o impedisce la ri-formazione di un GPC.

Casi della presente descrizione includono metodi di uso di anticorpi anti-LAP e/o anti-dominio LAP-simile per modificare l'attività del fattore di crescita. In alcuni casi, tali metodi possono includere l'uso di anticorpi anti-TGF- $\beta$ -LAP come anticorpi di attivazione di TGF- $\beta$ . In alcuni casi, metodi per usare e/o testare tali anticorpi possono includere qualunque dei metodi insegnati in Tsang, M. et al. 1995. Cytokine 7(5):389-97.

In alcuni casi, i metodi della presente descrizione possono essere usati per ridurre o eliminare l'attività del fattore di crescita, chiamati nella presente "metodi di inibizione". Alcuni tali metodi possono comprendere ritenzione del fattore di crescita in un GPC e/o promozione della ri-associazione del fattore di crescita in un GPC latente. In alcuni casi, i metodi di inibizione possono comprendere l'uso di un anticorpo

#### *Prodotti terapeutici*

In alcune forme di realizzazione, le composizioni dell'invenzione possono essere usate per trattare un'ampia varietà di malattie, disordini e/o condizioni. In alcuni casi, tali malattie, disordini e/o condizioni possono essere indicazioni correlate a TGF- $\beta$ . Come usato nella presente, il termine "indicazione correlata a TGF- $\beta$ " si riferisce a

qualunque malattia, disordine e/o condizione correlata/o all'espressione, all'attività e/o al metabolismo di una proteina membro della famiglia del TGF- $\beta$  o qualunque malattia, disordine e/o condizione che può trarre beneficio dalla modulazione dell'attività e/o dei livelli di una o più proteine membri della famiglia del TGF- $\beta$ . Le indicazioni correlate a TGF- $\beta$  possono includere, ma non vi si limitano, fibrosi, anemia dell'invecchiamento, cancro (incluso, ma non limitato a del colon, del rene, della mammella, melanoma maligno e glioblastoma,) facilitazione di una rapida emopoiesi dopo chemioterapia, guarigione ossea, sindromi da proliferazione endoteliale, asma e allergia, disordini gastrointestinali, aneurisma aortico, indicazioni orfane (quali sindrome di Marfan e malattia di Camurati-Engelmann,) obesità, diabete, artrite, sclerosi multipla, distrofia muscolare, sclerosi laterale amiotrofica (SLA,) malattia di Parkinson, osteoporosi, osteoartrite, osteopenia, sindromi metaboliche, disturbi della nutrizione, atrofia di un organo, malattia polmonare ostruttiva cronica (BPCO,) ed anoressia. Ulteriori indicazioni possono includere qualunque di quelle descritte nella Pubblicazione degli Stati Uniti No. 2013/0122007, nel Brevetto US No. 8,415,459 o nella Pubblicazione Internazionale No. WO 2011/151432.

L'efficacia di trattamento o il miglioramento di malattia possono essere valutati, ad es. misurando la progressione della malattia, la remissione della malattia, la severità dei sintomi, la riduzione del dolore, la qualità di vita, la dose di un medicamento necessaria per sostenere un effetto del trattamento, il livello di un marker di malattia o qualunque altro parametro misurabile appropriato per una data malattia che viene trattata o mirata per la prevenzione. È ben nella capacità di uno esperto nella tecnica monitorare l'efficacia del trattamento o della prevenzione misurando uno qualunque di tali parametri, o qualunque combinazione di parametri. In relazione alla somministrazione delle composizioni della presente invenzione, "efficace contro" ad esempio un cancro, indica che la somministrazione in un modo clinicamente appropriato si traduce in un effetto benefico per almeno una frazione statisticamente significativa di pazienti, quale un miglioramento di sintomi, una guarigione, una riduzione del carico della malattia, una riduzione della massa tumorale o dei numeri cellulari, un prolungamento della vita, un miglioramento nella qualità della vita, o un altro effetto generalmente riconosciuto come positivo da medici familiari con il trattamento del particolare tipo di cancro.

Un effetto di trattamento o preventivo è evidente quando c'è un miglioramento statisticamente significativo in uno

o più parametri dello stato di malattia, o da un mancato peggioramento o sviluppo di sintomi dove altrimenti sarebbe atteso. Come un esempio, una variazione favorevole di almeno il 10% in un parametro misurabile di malattia, e preferibilmente almeno del 20%, 30%, 40%, 50% o più può essere indicativo di trattamento efficace. L'efficacia per una data composizione o formulazione della presente invenzione può anche essere valutata utilizzando un modello animale sperimentale per la data malattia come noto nella tecnica. Quando si usa un modello animale sperimentale, l'efficacia del trattamento si evidenzia quando si osserva una variazione statisticamente significativa.

#### *Prodotti terapeutici per fibrosi*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere utili per modificare la fibrosi. In alcune forme di realizzazione, tali composti e/o composizioni sono antagonisti di TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  è riconosciuto come l'orchestratore centrale della risposta fibrotica. Anticorpi che prendono di mira TGF- $\beta$  diminuiscono la fibrosi in numerosi modelli preclinici. Tali anticorpi e/o composti basati su anticorpi includono LY2382770 (Eli Lilly, Indianapolis, IN). Anche inclusi sono quelli descritti nei Brevetti degli Stati Uniti Numeri US 6,492,497, US 7,151,169 e US 7,723,486 e nella pubblicazione degli Stati Uniti US2011/0008364.

La fibrosi è una sequela comune di molti tipi di malattie distruttive dei tessuti. Quando viene creato nuovo spazio dalla distruzione di cellule differenziate, progenitori o cellule staminali che normalmente occupano una nicchia nel tessuto, il pathway predefinito sembra essere la proliferazione di cellule del tessuto connettivo, ad esempio fibroblasti, per riempire lo spazio vuoto. Ciò è accompagnato dalla produzione di costituenti della matrice extracellulare includenti i collagene che porta a processo cicatriziale ed eliminazione permanente del tessuto.

Un difficile aspetto della fibrosi è la sua cronicità, che può richiedere una terapia continua fino a quando la sottostante distruzione di cellule parenchimali non viene terminata o le cellule vengono sostituite da pool di cellule staminali, o dal trapianto. Si ritiene che sia molto più facile arrestare la fibrosi che farla regredire. La famiglia del TGF-beta è di centrale importanza nella regolazione della crescita di cellule fibroblastiche e nella produzione di costituenti della matrice extracellulare incluso il collagene. Le integrine  $\alpha_v\beta_6$  e  $\alpha_v\beta_8$  (ed eventualmente  $\alpha_v\beta_1$ ) possono partecipare all'attivazione di TGF-beta1 e 3. L'integrina VLA-1 è un recettore per il collagene ed è

espressa sui linfociti solo tardivamente dopo la loro attivazione ed è fortemente implicata nello sviluppo della malattia fibrotica.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono progettati per bloccare l'attivazione delle integrine  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_8$  e  $\alpha_v\beta_1$  di TGF-beta per inibire la fibrosi. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono progettati per prendere di mira i siti di interazione tra i GPC e le LTBP lasciando nel contempo i siti di interazione tra i GPC e GARP non influenzati. Tali composti e/o composizioni della presente invenzione possono agire come anticorpi inibitori, prevenendo la segnalazione del fattore di crescita e inibendo la fibrosi. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono progettati per prendere di mira uno o più di TGF- $\beta$ 1, 2 e 3 o antigeni chimerici degli stessi.

Indicazioni fibrotiche per cui composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati terapeuticamente includono, ma non sono limitati a indicazioni polmonari [ad es. Fibrosi polmonare idiopatica (IPF), Disordine polmonare ostruttivo cronico (BPCO), Asma allergica, Danno polmonare acuto, Esofagite eosinofila, Ipertensione arteriosa polmonare e danno da gas chimici,] indicazioni renali [ad es. glomerulosclerosi diabetica, Glomerulosclerosi focale segmentale (FSGS), Malattia renale cronica, Fibrosi associata a trapianto di rene e rigetto cronico, nefropatia da IgA e Sindrome emolitico-uremica], fibrosi epatica [ad es. Steatoepatite non alcolica (NASH), Epatite virale cronica, Parassitemia, Errori congeniti del metabolismo, Fibrosi mediata da tossine, quale la fibrosi alcolica, Steatoepatite non alcolica-carcinoma epatocellulare (NASH-HCC), Cirrosi biliare primaria e Colangite sclerosante], fibrosi cardiovascolare (ad es. cardiomiopatia, cardiomiopatia ipertrofica, aterosclerosi e restenosi,) sclerosi sistemica, fibrosi cutanea (ad es. Fibrosi cutanea nella sclerosi sistemica, Sclerosi sistemica cutanea diffusa, Sclerodermia, Cicatrici cutanee patologiche, Cheloide, Cicatrici post chirurgiche, Intervento chirurgico di revisione di cicatrice, Cicatrici indotte da radiazioni e Ferite croniche) e cancri o fibrosi secondaria (ad es. Mielofibrosi, Cancro della testa e del collo, leucemia megacarioblastica acuta M7 e Mucosite.) Altre malattie, disordini o condizioni correlate alla fibrosi che possono essere trattate utilizzando composti e/o composizioni della presente invenzione, includono, ma non sono limitate a Sindrome di Marfan, Sindrome della cute rigida, Sclerodermia, Artrite reumatoide, fibrosi del midollo osseo, malattia di Crohn, Colite

ulcerosa, Lupus eritematoso sistemico, Distrofia muscolare, Contrattura di Dupuytren, Malattia di Camurati-Engelmann, Cicatrici neurali, Vitreoretinopatia proliferativa, Danno alla cornea, complicanze dopo intervento chirurgico di drenaggio del glaucoma e Sclerosi multipla.

Saggi utili nella determinazione dell'efficacia dei composti e/o delle composizioni della presente invenzione per la modificazione di fibrosi includono, ma non vi si limitano, saggi istologici per la conta dei fibroblasti e analisi immunoistochimiche di base note nella tecnica.

Modelli animali sono anche disponibili per l'analisi dell'efficacia di composti e/o composizioni della presente invenzione nella modificazione della fibrosi. Esempi di modelli animali di fibrosi utili per tale analisi possono includere, ad esempio, qualunque di quelli insegnati da Schaefer, D.W. et al., 2011. Eur Respir Rev. 20: 120, 85-97. Tali modelli possono includere, ma non sono limitati a quelli descritti nella Tabella 1 di quella pubblicazione, includenti modelli polmonari, modelli renali, modelli epatici, modelli cardiovascolari e/o modelli indotti dal collagene. Schaefer et al insegnano anche l'uso di pirfenidone nel trattamento della fibrosi. In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati in combinazione con pirfenidone.

In alcuni casi, composti e/o composizione dell'invenzione possono essere usati nel trattamento della fibrosi polmonare. Modelli di fibrosi polmonare possono essere usati nello sviluppo e/o nel test di composti e/o composizioni dell'invenzione. I modelli di fibrosi polmonare possono includere i modelli di danno polmonare indotto da bleomicina e/o i modelli di danno polmonare indotto da bleomicina cronico. Modelli di danno polmonare indotto da bleomicina possono essere realizzati come descritto da Schaefer et al, e anche da Horan et al. (Horan G.S. et al., 2008. Am J Respir Crit Care Med, 177(1):56-65. Epub 2007 Oct 4) Secondo lo studio di Horan, topi SV129 vengono esposti per via tracheale alla bleomicina che comporta lo sviluppo di fibrosi polmonare. Con questo modello, potenziali prodotti terapeutici vengono somministrati attraverso iniezioni intraperitoneali mentre tessuto del polmone postmortem o raccolte di lavaggio broncoalveolare possono essere analizzati per i livelli di idrossiprolina come un indicatore di attività fibrotica. Utilizzando la stessa tecnica, topi che portano un gene reporter della luciferasi, guidato dal promotore del gene del collagene Ia2 possono essere utilizzati nel modello in modo tale che l'attività fibrotica possa essere determinata dal saggio di attività della

luciferasi in funzione dell'induzione del gene del collagene. Ulteriori modelli polmonari indotti da bleomicina possono essere realizzati secondo quelli descritti da Thrall et al (Thrall, R.S. et al., 1979. Am J Pathol. 95:117-30.) Ulteriori modelli polmonari possono includere i modelli murini di asma. Il rimodellamento delle vie respiratorie (fibrosi polmonare) può essere un problema serio in soggetti con asma cronica. Modelli di asma possono includere qualunque di quelli descritti da Nials et al (Nials, A.T. et al., 2008. Disease Models and Mechanisms. 1:213-20) Modelli di malattia polmonare ostruttiva cronica (BPCO) possono essere utilizzati. Tali modelli possono includere qualunque di quelli descritti da Vlahos et al (Vlahos, R. et al., 2014. Clin Sci. 126:253-65) Modelli di enfisema da fumo di sigaretta possono essere utilizzati. Tali modelli possono essere realizzati come descritto in Ma et al. 2005. J Clin Invest. 115:3460-72. Modelli di fibrosi polmonare cronica possono essere usati. Tali modelli nei roditori possono essere realizzati secondo il modello di instillazione intratracheale di fluoresceina isotiocianato (FITC) descritto in Roberts, S.N. et al. 1995. J Pathol. 176(3):309-18. Modelli di danno polmonare indotto da amianto e silice possono anche essere utilizzati. Tali modelli possono essere realizzati come descritto in Coin, P.G. et al., 1996. Am J Respir Crit Care Med. 154(5):1511-9. In alcuni casi, modelli di irraggiamento polmonare possono essere utilizzati. Tali modelli possono essere realizzati come descritto in Pauluhn, J. et al. 2001. Toxicology. 161:153-63. In alcuni casi, modelli di danno polmonare indotto da forbole miristato acetato (PMA) possono essere utilizzati. Tali modelli possono essere realizzati come descritto in Taylor, R.G. et al., 1985. Lab Invest. 52(1):61-70.

Modelli di fibrosi renale possono essere utilizzati per sviluppare e/o testare composti e/o composizioni della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, un modello di fibrosi renale ben consolidato, il modello di ostruzione ureterale unilaterale (UUO), può essere utilizzato. In questo modello, i topi sono sottoposti a legatura dell'uretere prossimale. Dopo un periodo che va da ore a giorni, la fibrosi viene esaminata nelle regioni bloccate dalla legatura (Ma, L.J. et al., 2003. American Journal of Pathology. 163(4):1261-73) In un esempio, questo metodo è stato utilizzato da Meng, X.M. et al. (Meng, X.M. et al., Smad2 Protects against TGF-beta/Smad3-Mediated Renal Fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2010 Sep;21(9):1477-87. Epub 2010 Jul 1) per esaminare il ruolo di SMAD-2 nella fibrosi renale. SMAD-2 è un membro intracellulare del pathway di segnalazione cellulare del TGF-

beta. In alcuni casi, modelli di nefropatia indotta da ciclosporina A possono essere utilizzati. Tali modelli possono essere realizzati come descritto in Ling, H. et al., 2003. *J Am Soc Nephrol.* 14:377-88. In alcuni casi, possono essere utilizzati modelli renali di Sindrome di Alport. Topi transgenici con knockout del collagene III possono essere utilizzati in studi sulla sindrome di Alport. Questi topi sviluppano fibrosi progressiva nei loro reni. Modelli di sindrome di Alport possono essere realizzati come descritto in Koepke, M.L. et al., 2007. *Nephrol Dial Transplant.* 22(4): 1062-9 e/o in Hahm, K. et al., 2007. *Am J Pathol.* 170(1): 110-5.

In alcuni casi, modelli di fibrosi cardiovascolare possono essere utilizzati per sviluppare e/o testare composti e/o composizioni dell'invenzione per il trattamento di indicazioni fibrotiche cardiovascolari. In alcuni casi, possono essere utilizzati modelli di danno vascolare. Tali modelli possono includere modelli di danno da palloncino. In alcuni casi, questi possono essere realizzati come descritto in Smith et al., 1999. *Circ Res.* 84(10): 1212-22. È stato mostrato che il blocco di TGF- $\beta$  in questo modello blocca la formazione della neointima. Di conseguenza, anticorpi inibenti il TGF- $\beta$  della presente invenzione possono essere utilizzati per ridurre e/o bloccare la formazione della neointima.

In alcune forme di realizzazione, modelli di fibrosi epatica possono essere utilizzati per sviluppare e/o testare composti e/o composizioni dell'invenzione per il trattamento di indicazioni fibrotiche epatiche. Modelli epatici possono includere qualunque di quelli descritti in Iredale, J.P. 2007. *J Clin Invest.* 117(3):539-48. Questi includono, ma non vi si limitano, qualunque dei modelli elencati nelle Tabelle 1 e/o 2. In alcuni casi, i modelli epatici possono includere modelli di fibrosi epatica indotta da tetracloruro di carbonio. Tali modelli possono essere realizzati secondo i metodi descritti in Fujii, T. et al., 2010. *BMC Gastroenterology.* 10:79.

In alcune forme di realizzazione, modelli di cicatrizzazione delle ferite possono essere usati per sviluppare e/o testare composti e/o composizioni dell'invenzione per il trattamento di indicazioni di ferite fibrotiche. I modelli di ferite possono includere modelli di ferite croniche.

In alcuni casi, modelli di fibrosi correlata a danno del GI possono essere utilizzati per sviluppare e/o testare composti e/o composizioni dell'invenzione per trattamento di fibrosi correlata al GI. Tali modelli di danno possono includere, ma non sono limitati a modelli di colite indotta da acido 2,4,6-trinitrobenzenesolfonico (TNBS). Tali

modelli possono essere realizzati come descritto in Scheiffele, F. et al., 2002. Curr Protoc Immunol. Capitolo 15:Unità 15.19.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni dell'invenzione possono essere utilizzati per trattare malattie, disordini e/o condizioni correlate a fibrosi del midollo osseo. In alcuni casi, modelli di fibrosi del midollo osseo possono essere utilizzati per sviluppare e/o testare tali composti e/o composizioni. I modelli possono includere il modello del trasferimento adottivo di cellule del midollo descritto in Lacout, C. et al., 2006. Blood. 108(5):1652-60 e modelli di topi transgenici, includenti, ma non limitati al modello descritto in Vannucchi, A.M. et al., 2002. Blood. 100(4): 1123-32. Inoltre i modelli possono includere modelli di mielofibrosi indotta da trombopoietina. Tali modelli possono essere realizzati come descritto in Chagraoui, H. et al., 2002. Blood. 100(10):3495-503.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni dell'invenzione possono essere utilizzati per trattare malattie, disordini e/o condizioni correlate a distrofia muscolare (MD) includenti, ma non limitate a MD di Duchenne e MD di Becker. In alcuni casi i modelli di MD possono essere utilizzati per sviluppare e/o testare tali composti e/o composizioni. Tali modelli possono includere quelli descritti in Ceco, E. et al., 2013. FEBS J. 280(17):4198-209.

Composti e/o composizioni dell'invenzione possono, in alcuni casi, essere combinati con uno o più altri prodotti terapeutici per il trattamento di una o più indicazioni fibrotiche. Esempi di tali altri prodotti terapeutici possono includere, ma non sono limitati a antagonisti del recettore LPA1, inibitori della lisil ossidasi 2, inibitori di hedgehog, inibitori di IL-3/IL-4, inibitori di CTGF, anticorpi anti- $\alpha_v\beta_6$  e anticorpi anti-IL-13.

In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente invenzione sono progettati per aumentare l'attività del fattore di crescita TGF- $\beta$  di promuovere fibrosi per trattare malattie, disordini e/o condizioni dove la fibrosi può essere vantaggiosa. Tali composti possono includere anticorpi di attivazione.

#### *Prodotti terapeutici per la mielofibrosi*

La mielofibrosi è un cancro del sangue cronico causato da mutazioni nelle cellule staminali del midollo osseo. La malattia è caratterizzata da una capacità compromessa di produrre cellule del sangue normali. I pazienti sviluppano

splenomegalia ed epatomegalia e si verifica eccessiva fibrosi nel midollo osseo. Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono il nome collettivo per tre tipi correlati di mielofibrosi con caratteristiche cliniche differenti: mielofibrosi primaria (PMF), trombocitemia essenziale e policitemia vera. Tutte e tre hanno una segnalazione iperattiva del pathway di segnalazione cellulare JAK-STAT (Klampfi, et al., 2013. NEJM 369:2379-90) La mielofibrosi primaria (PMF) è caratterizzata da aumentata angiogenesi, fibrosi da reticolina e da collagene. Con l'avanzare della malattia, il numero di osteoclasti aumenta e il midollo osseo diventa non aspirabile. Parte della fibrosi della PMF può essere revertita mediante trapianto di cellule staminali (SCT.) Il 98% degli individui con policitemia vera hanno JAK2 mutata che comporta segnalazione JAK-STAT iperattiva.

Le attuali terapie per le MPN includono trapianto allogenico di cellule ematopoietiche (HCT) ed inibizione della Janus chinasi (JAK). L'HCT allogenico è associato con fino al 10% di mortalità come pure con fallimento dell'innesto e significativi effetti collaterali e tossicità. La terapia di inibizione di JAK comprende l'uso di Ruxolitinib (Rux,) un inibitore a piccola molecola di JAK2 che è stato approvato nel 2011 per trattare le MPN. Rux è in commercio con i nomi JAKAFI® e JAKAVI® dalla Incyte Pharmaceuticals (Wilmington, DE) e dalla Novartis (Basel, Switzerland). Sebbene sia in grado di migliorare la splenomegalia e l'epatomegalia, Rux non è curativo ed alcuni studi non mostrano molto beneficio (Odenike, O., 2013. Hematology. 2013(1):545-52)

In alcuni casi, composti e/o composizioni dell'invenzione possono essere usati per trattare disordini mieloproliferativi, includenti, ma non limitati a mielofibrosi primaria, mielofibrosi secondaria, trombocitemia essenziale, policitemia vera, mielofibrosi idiopatica e leucemia mieloide cronica. In alcuni casi, i trattamenti possono essere effettuati in combinazione con una o più terapie note per la mielofibrosi, includenti, ma non limitate a HCT allogenico, inibizione della JAK, trattamento con fresolimumab (GC1008; Genzyme, Cambridge, MA) per bloccare TGF- $\beta$ 1, 2 e 3 (Mascarenhas, J. et al., 2014. Leukemia and Lymphoma. 55:450-2) trattamento con simtuzumab (Gilead Biosciences, Foster City, CA) per bloccare attività della lisil ossidasi e reticolazione del collagene e trattamento con Pentraxin-2 (Promedior, Lexington, MA) per stimolare macrofagi regolatori ed inibire i mielofibroblasti. In alcuni casi, modelli di disordini mieloproliferativi possono essere utilizzati per sviluppare e/o testare tali composti e/o composizioni dell'invenzione destinati al trattamento di mielofibrosi. I modelli possono

includere il modello del trasferimento adottivo di cellule del midollo descritto in Lacout, C. et al., 2006. Blood. 108(5):1652-60 e modelli di topi transgenici, includenti, ma non limitati al modello descritto in Vannucchi, A.M. et al., 2002. Blood. 100(4): 1123-32. I modelli di mielofibrosi possono includere mielofibrosi indotta da trombopoietina. Tali modelli possono essere realizzati come descritto in Chagraoui, H. et al., 2002. Blood. 100(10):3495-503. È stato mostrato che TGF- $\beta$ 1 è l'agonista di fibrosi primaria secondo questo modello. Inoltre modelli di mielofibrosi possono essere realizzati come descritto in Mullally, A. et al., 2010. Cancer Cell. 17:584-96.

*Prodotti terapeutici per la formazione di cicatrici e la guarigione delle ferite*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere utili nel modificare la guarigione di ferite e/o la formazione di cicatrici. In alcuni casi, composti e/o composizioni dell'invenzione possono garantire una corretta guarigione delle ferite (incluse, ma non limitate alle ferite croniche.) In alcuni casi, composti e/o composizioni dell'invenzione possono essere usati per ridurre, trattare e/o prevenire la formazione di cicatrici. Tali composti e/o composizioni possono comprendere anticorpi anti-TGF- $\beta$ . In alcuni casi, anticorpi attivanti TGF- $\beta$  possono essere usati per promuovere la guarigione nelle ferite.

*Prodotti terapeutici per disordini del metabolismo del ferro*

Durante la chemioterapia, la divisione cellulare viene temporaneamente arrestata per impedire la crescita e la diffusione delle cellule cancerose. Un effetto collaterale sfortunato è la perdita di globuli rossi che dipendono dalla divisione cellulare attiva delle cellule del midollo osseo. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per trattare l'anemia associata alla chemioterapia. In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere combinati con qualunque dei terapeutici descritti nella presente per aumentare l'efficacia.

*Prodotti terapeutici per anemia, trombocitopenia e neutropenia*

Durante la chemioterapia, la divisione cellulare viene temporaneamente arrestata per impedire la crescita e la diffusione delle cellule cancerose. Un effetto collaterale sfortunato è la perdita di globuli rossi, piastrine e globuli bianchi del sangue che dipendono dalla divisione cellulare attiva delle cellule del midollo osseo. In alcune forme

di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere progettati per trattare pazienti affetti da anemia (la perdita di globuli rossi), trombocitopenia (un decremento nel numero di piastrine) e/o neutropenia (un decremento nel numero di neutrofilo).

*Prodotti terapeutici per il cancro*

Vari cancri possono essere trattati con composti e/o composizioni della presente invenzione. Come usato nella presente, il termine "cancro" si riferisce a qualunque di varie neoplasie maligne caratterizzate dalla proliferazione di cellule anaplastiche che tendono a invadere il tessuto circostante e metastatizzano in nuovi siti del corpo e si riferisce anche alla condizione patologica caratterizzata da tali crescite neoplastiche maligne. I cancri possono essere tumori solidi o tumori maligni ematologici, ed includono ma non vi sono limitati, tutti i tipi di linfomi/leucemie, carcinomi e sarcomi, quali quei cancri o tumori trovati nell'ano, nella vescica, nel dotto biliare, nell'osso, nel cervello, nella mammella, nella cervice, nel colon/retto, nell'endometrio, nell'esofago, nell'occhio, nella cistifellea, nella testa e nel collo, nel fegato, nel rene, nella laringe, nel polmone, nel mediastino (torace), nella bocca, nelle ovaie, nel pancreas, nel pene, nella prostata, nella pelle, nell'intestino tenue, nello stomaco, nel midollo spinale, nel coccige, nei testicoli, nella tiroide e nell'utero.

Nel cancro, il TGF- $\beta$  può essere promuovente la crescita o inibente la crescita. Come un esempio, nei cancri pancreatici, tumori con SMAD4 wild-type possono sperimentare una crescita inibita in risposta a TGF- $\beta$ , ma con il progredire della malattia, il recettore tipo II costitutivamente attivato è tipicamente presente. Inoltre, vi sono cancri pancreatici SMAD4-null. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono progettati per prendere di mira selettivamente componenti di pathway di segnalazione del TGF- $\beta$  che funzionano unicamente in una o più forme di cancro. Le leucemie, o cancri del sangue o del midollo osseo che sono caratterizzati da una anormale proliferazione dei globuli bianchi cioè, i leucociti, possono essere suddivise in quattro principali classificazioni includenti Leucemia linfoblastica acuta (ALL), Leucemia linfocitica cronica (CLL), Leucemia mielogena acuta o leucemia mieloide acuta (AML) (AML con traslocazioni tra cromosoma 10 e 11 [t(10, 11)], cromosoma 8 e 21 [t(8;21)], cromosoma 15 e 17 [t(15;17)], ed inversioni nel cromosoma 16 [inv(16)]; AML con displasia multi-lignaggio, che include pazienti che hanno avuto una precedente sindrome

mielodisplastica (MDS) o malattia mieloproliferativa che si trasforma in AML; AML e sindrome mielodisplastica (MDS), correlata a terapia, la quale categoria include pazienti che hanno avuto una precedente chemioterapia e/o radiazione e successivamente sviluppano AML o MDS; d) AML non altrimenti classificata, che include sottotipi di AML che non rientrano nelle suddette categorie; ed e) Leucemie acute di lignaggio ambiguo, che si hanno quando le cellule leucemiche non possono essere classificate come cellule mieloidi o linfoidi, o dove ambedue i tipi di cellule sono presenti); e Leucemia mielogena cronica (CML).

I tipi di carcinomi includono, ma non vi si limitano, papilloma/carcinoma, coriocarcinoma, tumore del seno endodermico, teratoma, adenoma/adenocarcinoma, melanoma, fibroma, lipoma, leiomioma, rhabdomioma, mesotelioma, angioma, osteoma, condroma, glioma, linfoma/leucemia, carcinoma a cellule squamose, carcinoma a piccole cellule, carcinomi indifferenziati a grandi cellule, carcinoma a cellule basali e carcinoma sinonasale indifferenziato.

I tipi di sarcomi includono, ma non vi si limitano, sarcoma dei tessuti molli quali sarcoma alveolare delle parti molli, angiosarcoma, dermatofibrosarcoma, tumore desmoide, tumore desmoplastico a piccole cellule rotonde, condrosarcoma extrascheletrico, osteosarcoma extrascheletrico, fibrosarcoma, emangiopericitoma, emangiosarcoma, sarcoma di Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfoangiosarcoma, linfofibrosarcoma, istiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinoviale, e tumore di Askin, sarcoma di Ewing (tumore neuroectodermico primitivo), emangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma, e condrosarcoma.

In alcune forme di realizzazione, composizioni dell'invenzione possono essere usate per trattare uno o più tipi di cancro o condizioni correlate al cancro che possono includere, ma non sono limitati a cancro del colon, cancro del rene, cancro della mammella, melanoma maligno e glioblastomi (Schlingensiepen et al., 2008; Ouhtit et al., 2013.)

I gliomi ad alto grado (ad es. gli astrocitomi anaplastici e i glioblastomi) costituiscono circa il 60% dei tumori maligni del cervello. È stato trovato che TGF- $\beta$ 2 viene sovra-espresso in oltre il 90% di tali gliomi e i livelli di espressione sono correlati alla progressione tumorale. Inoltre, studi utilizzando la riduzione del TGF- $\beta$ 2 a livello di mRNA nei pazienti con cancro hanno mostrato un significativo miglioramento nell'esito del tumore (Bogdahn et

al., 2010.) Alla luce di questi studi, alcune composizioni della presente descrizione possono essere usate terapeuticamente per trattare individui con gliomi ad alto grado. Tali composizioni possono agire per ridurre i livelli di TGF- $\beta$ 2 libero e/o i livelli di attività di TGF- $\beta$ 2.

In alcuni casi, l'attività di TGF- $\beta$ 2 può contribuire allo sviluppo di tumore attraverso modulazione di metastasi, angiogenesi, proliferazione e/o funzioni immunosoppressive che compromettono la sorveglianza immunologica dei tumori (Schlingensiepen et al., 2008.) Uno studio da parte di Reed et al (Reed et al., 1994) ha dimostrato l'espressione di mRNA di TGF- $\beta$ 2 in una grande percentuale di lesioni melanocitiche inclusi melanomi primari invasivi e melanomi metastatici. Alcuni composti e/o composizioni della presente descrizione possono essere usati per modulare attività di TGF- $\beta$ 2 e/o livelli in tali lesioni e/o impedire la formazione di lesioni. È stato anche mostrato che la crescita di cellule di melanoma nel parenchima cerebrale è influenzata dall'attività di TGF- $\beta$ 2 (Zhang et al., 2009). Alcuni composti e/o composizioni della presente descrizione possono essere usati per impedire o controllare tale crescita cellulare attraverso la modulazione dell'attività e/o dei livelli di TGF- $\beta$ 2.

Tra le donne in tutto il mondo, il cancro alla mammella è la forma più prevalente di cancro. La metastasi del cancro alla mammella è mediata in parte attraverso interazioni tra cellule cancerose e componenti della matrice extracellulare, quale l'acido ialuronico (HA.) È stato mostrato che CD44 è il principale recettore per HA sulle cellule cancerose (Ouhtit et al., 2013.) L'interazione tra CD44 e HA porta alla modulazione di motilità cellulare, adesione di sopravvivenza e proliferazione. La trascrizione di TGF- $\beta$ 2 anche viene sovra-regolata tramite l'attività di segnalazione di CD44 e si ritiene che contribuisca ai cambiamenti risultanti nella motilità cellulare. Sfortunatamente, le attuali terapie hanno limitata efficacia e molte comportano effetti avversi per via di una mancanza di specificità. In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente descrizione possono essere usati per modificare l'attività cellulare indotta da sovra-regolazione di TGF- $\beta$ 2.

L'invenzione riguarda inoltre l'uso di composti e/o composizioni della presente invenzione per il trattamento di una o più forme di cancro, in combinazione con altri prodotti farmaceutici, ad es., con prodotti farmaceutici noti, quali, ad esempio, quelli che sono attualmente impiegati per il trattamento di questi disordini. Ad esempio, i composti e/o le composizioni della presente invenzione possono essere somministrati anche in unione con uno o

più trattamenti anti-cancro aggiuntivi, quali prodotti biologici, chemioterapia e radioterapia. Di conseguenza, un trattamento può includere, ad esempio, imatinib (Gleevac), acido all-trans-retinoico, un trattamento a base di anticorpi monoclonali (gemtuzumab, ozogamicina), chemioterapia (ad es., Clorambucile, prednisone, prednisolone, vincristina, citarabina, clofarabina, inibitori della farnesil transferasi, decitabina, inibitori di MDR1), rituximab, interferone- $\alpha$ , farmaci a base di antracicline (quale daunorubicina o idarubicina), L-asparaginasi, doxorubicina, ciclofosfamide, doxorubicina, bleomicina, fludarabina, etoposide, pentostatina, o cladribina), trapianto del midollo osseo, trapianto di cellule staminali, radioterapia, farmaci anti-metabolita (metotrexato e 6-mercaptopurina), o qualunque combinazione degli stessi.

La terapia tramite radiazioni (anche chiamata radioterapia, terapia con raggi X, o irraggiamento) è l'uso di radiazione ionizzante per uccidere le cellule cancerose e restringere i tumori. La terapia mediante radiazioni può essere somministrata esternamente tramite radioterapia a fasci esterni (EBRT) o internamente tramite brachiterapia. Gli effetti della terapia tramite radiazioni sono localizzati e confinati alla regione che viene trattata. La terapia tramite radiazioni può essere usata per trattare quasi ogni tipo di tumore solido, inclusi cancri del cervello, della mammella, della cervice, della laringe, del polmone, del pancreas, della prostata, della pelle, dello stomaco, dell'utero, o sarcomi dei tessuti molli. La radiazione viene anche usata per trattare leucemia e linfoma.

La chemioterapia è il trattamento del cancro con farmaci che possono distruggere le cellule cancerose. Nell'uso corrente, il termine "chemioterapia" solitamente si riferisce a farmaci citotossici che colpiscono genericamente le cellule in rapida divisione, in contrasto alla terapia mirata. I farmaci chemioterapici interferiscono con la divisione cellulare in vari modi possibili, ad esempio con la duplicazione del DNA o la separazione dei cromosomi appena formati. La maggior parte delle forme chemioterapiche prendono di mira tutte le cellule in rapida divisione e non sono specifiche per le cellule cancerose, sebbene qualche grado di specificità possa derivare dall'incapacità di molte cellule cancerose di riparare il danno al DNA, mentre le cellule normali generalmente possono farlo.

La maggior parte dei regimi chemioterapici sono dati in combinazione. Agenti chemioterapici esemplari includono, ma non sono limitati a, 5-FU Enhancer, 9-AC, AG2037, AG3340, Inibitore di Aggrecanasi, Aminoglutetimide, Amsacrina (m-AMSA), Asparaginasi, Azacitidina, Batimastat (BB94), BAY 12-9566, BCH-

4556, Bis-Naftalimide, Busulfan, Capecitabina, Carboplatino, Carmustaina+Polifepr Osan, inibitori di cdk4/cdk2, Clorombucile, CI-994, Cisplatino, Cladribina, CS-682, Citarabina HCl, D2163, Dactinomicina, Daunorubicina HCl, DepoCyt, Dexifosamide, Docetaxel, Dolastatin, Doxifluridina, Doxorubicina, DX8951f, E 7070, EGFR, Epirubicina, Eritropoietina, Estramustina fosfato sodico, Etoposide (VP16-213), Inibitore di Farnesil Transferasi, FK 317, Flavopiridolo, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracile (5-FU), Flutamide, Fraglyline, Gemcitabina, Esametilmelamina (HMM), Idrossiurea (idrossicarbamide), Ifosfammide, Interferone Alfa-2a, Interferone Alfa-2b, Interleuchina-2, Irinotecan, ISI 641, Krestin, Lemonal DP 2202, Leuprolide acetato (fattore rilasciante LHRH analogo), Levamisolo, LiGLA (litio-gamma linolenato), Semi di Iodine, Lometexol, Lomustina (CCNU), Marimistat, Mecloretamina HCl (mostarda azotata), Megestrol acetato, Meglamina GLA, Mercaptopurina, Mesna, Mitoguazone (metil-GAG; metile gliossal bis-guanilidrazone; MGBG), Mitotano (o.p'-DDD), Mitoxantrone, Mitoxantrone HCl, MMI 270, MMP, MTA/LY 231514, Octreotide, ODN 698, OK-432, Platino Orale, Taxoide Orale, Paclitaxel (TAXOL.RTM.), Inibitori di PARP, PD 183805, Pentostatina (2' deossicoformicina), PKC 412, Plicamicina, Procarbazina HCl, PSC 833, Ralitrexed, Inibitore di Farnesil Transferasi di RAS, Inibitore di Oncogene ras, Semustina (metil-CCNU), Streptozocina, Suramin, Tamoxifen citrato, Analogo di Taxano, Temozolomide, Teniposide (VM-26), Tioguanina, Tiotepa, Topotecan, Tirosina Chinasi, UFT (Tegafur/Uracile), Valrubicina, Vinblastina solfato, Vindesina solfato, VX-710, VX-853, YM 116, ZD 0101, ZD 0473/Anormed, ZD 1839, ZD 9331.

Le terapie biologiche utilizzano il sistema immunitario del corpo, direttamente o indirettamente, per combattere il cancro o ridurre gli effetti collaterali che possono essere causati da alcuni trattamenti anticancro. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere considerati terapie biologiche per il fatto che possono stimolare l'azione del sistema immunitario contro uno o più tumori, ad esempio. Tuttavia, questo approccio può anche essere considerato con altri tali approcci biologici, ad es., terapie che modificano la risposta immunitaria quale la somministrazione di interferoni, interleuchine, fattori stimolanti le colonie, altri anticorpi monoclonali, vaccini, terapia genica, ed agenti immunomodulanti aspecifici sono anche immaginati come terapie anti-cancro da combinare con i composti e/o le composizioni della presente invenzione.

I farmaci per terapia mirata a piccola molecola sono generalmente inibitori di domini enzimatici su proteine mutate, sovra-esprese, o altrimenti critiche all'interno della cellula cancerosa, quali gli inibitori di tirosina chinasi imatinib (Gleevec/Glivec) e gefitinib (Iressa). Esempi di terapie basate su anticorpi monoclonali che possono essere usate con composti e/o composizioni della presente invenzione includono, ma non vi si limitano, l'anticorpo anti-HER2/neu trastuzumab (Herceptin) usato nel cancro della mammella, e l'anticorpo anti-CD20 rituximab, usato in una varietà di tumori maligni a cellule B. La crescita di alcuni cancri può essere inibita fornendo o bloccando certi ormoni. Tipici esempi di tumori ormone-sensibili includono certi tipi di cancri della mammella e della prostata. La rimozione o il blocco di estrogeno o testosterone è spesso un importante trattamento aggiuntivo. In certi cancri, la somministrazione di agonisti degli ormoni, quali i progestinici può essere terapeuticamente benefica.

L'immunoterapia contro il cancro si riferisce a una serie diversificata di strategie terapeutiche progettate per indurre il sistema immunitario proprio del paziente a combattere il tumore, e includono, ma non vi si limitano, immunoterapia intravesicale con BCG per cancro della vescica superficiale, vaccini per generare risposte immunitarie specifiche, quali per melanoma maligno e carcinoma a cellule renali, e l'uso di Sipuleucel-T per cancro della prostata, in cui cellule dendritiche dal paziente vengono caricate con peptidi di fosfatasi acida della prostata per indurre una risposta immunitaria specifica contro cellule derivate dalla prostata.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono progettati per impedire l'inibizione delle cellule T. Tali composti e/o composizioni possono impedire la dissociazione di fattori di crescita dal prodominio del GPC o da componenti della matrice extracellulare e/o della matrice cellulare includenti, ma non limitati a GARP, fibrilline o LTBP.

#### *Prodotti terapeutici per la guarigione ossea*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per trattare disordini ossei e/o migliorare la guarigione o la riparazione ossea. Il rimodellamento delle cellule dell'osso è un processo permanente che aiuta a mantenere l'integrità scheletrica. Questo processo implica cicli di riassorbimento dell'osso osteoclastico e formazione di nuovo osso che funzionano per riparare difetti e aree di debolezza nell'osso. Membri della famiglia del TGF-beta, preferibilmente le BMP, si ritiene che siano importanti fattori nell'accoppiamento dei

processi di riassorbimento e formazione tramite gli osteoclasti. Membri della famiglia del TGF-beta sono prevalenti nella matrice dell'osso e sovra-regolati da danno all'osso. Si ritiene anche che membri della famiglia del TGF-beta conferiscano forza alla matrice dell'osso completamente formato, conferendo resistenza alla frattura. Il ruolo dei membri della famiglia del TGF-beta nel rimodellamento osseo li rende bersagli attraenti per potenziali prodotti terapeutici per trattare disordine e malattia dell'osso.

Numerose malattie e/o disordini colpiscono le ossa e le articolazioni. Tali malattie e/o disordini possono essere congeniti, genetici e/o acquisiti. Tali malattie e/o disordini includono, ma non vi si limitano, cisti ossee, artrite infettiva, malattia di Paget dell'osso, malattia di Osgood-Schlatter, malattia dell'osso di Kohler, speroni ossei (osteofiti), tumori dell'osso, craniosinostosi, fibrodiplosia ossificante progressiva, displasia fibrosa, tumore a cellule giganti dell'osso, ipofosfatasia, sindrome di Klippel-Feil, malattia metabolica dell'osso, osteoartrite, osteite deformante, osteite fibrosa cistica, osteite pubica, osteite condensante, osteite condensante dell'ileo, osteocondrite dissecante, osteocondroma, osteogenesi imperfetta, osteomalacia, osteomielite, osteopenia, osteopetrosi, osteoporosi, osteosarcoma, iperostosi porotica, iperparatiroidismo primario, osteodistrofia renale e acqua sul ginocchio.

Modelli murini per valutare l'efficacia di prodotti terapeutici sullo sviluppo e sulla riparazione dell'osso sono ben noti nella tecnica. In un tale modello dimostrato da Mohammad, et al. (Mohammad, K.S. et al., Pharmacologic inhibition of the TGF-beta type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. PLoS One. 2009;4(4):e5275. Epub 2008 Apr 16), l'inibizione del recettore tipo I del TGF-beta è stata realizzata in topi C57Bl/6 attraverso somministrazione di due volte al giorno di un potente inibitore, SD-208, mediante alimentazione forzata. Successivamente, la densità minerale ossea (BMD) è stata analizzata utilizzando un densitometro per topi PIXImus (GE Lunar II, Faxitron Corp., Wheeling, IL). Variazioni nella BMD sono espresse come una percentuale di variazione nell'area scannerizzata. Lo studio ha riscontrato che dopo 6 settimane di trattamento, i topi maschi esibivano un aumento del 4.12% nell'accumulo di osso mentre i topi femmine esibivano un aumento del 5.2%.

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere utili come terapie per fratture ossee semplici

o complesse e/o per la riparazione ossea. In tali trattamenti, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere introdotti nel sito del danno direttamente o attraverso l'incorporazione in dispositivi di impianto e biomatrici rivestite. Inoltre, sono contemplati trattamenti in cui composti e/o composizioni della presente invenzione vengono forniti insieme con uno o più GPC in un'area di trattamento, facilitando il lento rilascio di uno o più fattori di crescita da tali GPC.

*Prodotti terapeutici per condizioni di proliferazione angiogenica e endoteliale*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per trattare sindromi, malattie o disordini di proliferazione angiogenica e endoteliale. Il termine "angiogenesi", come usato nella presente si riferisce alla formazione e/o alla riorganizzazione di nuovi vasi sanguigni. La malattia angiogenica implica la perdita di controllo sull'angiogenesi nel corpo. In tali casi, la crescita, la formazione o la riorganizzazione dei vasi sanguigni può essere iperattiva (incluso durante la crescita di tumore e cancro dove la crescita cellulare incontrollata richiede aumentato apporto di sangue) o insufficiente a sostenere i tessuti sani. Tali condizioni possono includere, ma non sono limitati a angiomi, angiosarcomi, telangiectasia, linfoangioma, anomalie vascolari congenite, angiogenesi tumorale e strutture vascolari dopo intervento chirurgico. Eccessiva angiogenesi si osserva nel cancro, nella degenerazione maculare, nella cecità diabetica, nell'artrite reumatoide, nella psoriasi come pure in molte altre condizioni. L'eccessiva angiogenesi viene spesso promossa da eccessiva espressione del fattore di crescita angiogenico. Composti e/o composizioni della presente invenzione possono agire per bloccare fattori di crescita coinvolti nell'angiogenesi eccessiva. In alternativa, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere utilizzati per promuovere la segnalazione del fattore di crescita per accrescere l'angiogenesi in condizioni dove l'angiogenesi viene inibita. Tali condizioni includono, ma non sono limitate a coronaropatia, ictus, diabete e ferite croniche.

*Prodotti terapeutici per indicazioni e malattie orfane*

I composti e/o le composizioni della presente invenzione possono essere usati per trattare indicazioni e/o malattie orfane. Tali malattie includono la sindrome di Marfan. Tale sindrome è un disordine del tessuto connettivo, che influisce sulla crescita e sullo sviluppo del corpo. Tessuti e organi che sono più severamente compromessi

includono il cuore, i vasi sanguigni, le ossa, gli occhi, i polmoni ed il tessuto connettivo che circonda il midollo spinale. Sfortunatamente, gli effetti possono essere rischiosi per la vita. La sindrome di Marfan è causata da una mutazione genetica nel gene che produce la fibrillina, un componente importante del tessuto connettivo corporeo. La proteina legante TGF- $\beta$  latente (LTBP) è un importante regolatore della segnalazione del TGF- $\beta$  che esibisce stretta identità con proteine membri della famiglia della fibrillina. LTBP funzionale è richiesta per controllare il rilascio di TGF- $\beta$  attivo (Oklu, R. et al., The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J.* 2000 Dec 15;352 Pt 3:601-10). In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono progettati per modificare il profilo di rilascio di TGF- $\beta$ . In tali forme di realizzazione, composti e/o composizioni possono comprendere anticorpi caratterizzati come anticorpi inibitori.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere utili nel trattamento di malattia di Camurati-Engelmann (CED). Tale malattia colpisce principalmente le ossa, comportando aumentata densità ossea. Particolarmente colpite sono le ossa lunghe delle gambe e delle braccia; tuttavia, possono essere interessate anche le ossa dell'abilità e delle anche. La malattia comporta dolore alle gambe e alle braccia come pure una varietà di altri sintomi. La CED è molto rara, riportata in approssimativamente 200 individui in tutto il mondo ed è causata da una mutazione nel gene del TGF- $\beta$ . Il TGF- $\beta$  prodotto nei corpi di questi individui ha un prodominio difettivo, che porta a segnalazione di TGF- $\beta$  iperattiva (Janssens, K. et al., Transforming growth factor-beta 1 mutations in Camurati-Engelmann disease lead to increased signaling by altering either activation or secretion of the mutant protein. *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7718-24. Epub 2002 Dec 18). Come descritto da Shi et al., (Shi, M. et al., Latent TGF-beta structure and activation. *Nature.* 2011 Jun 15;474(7351):343-9,) tra le mutazioni della CED, Y81H perturba un residuo di elica  $\alpha 2$  che sostiene il dito del TGF- $\beta$ . Le mutazioni di carica inversa E169K e H222D perturbano un ponte salino pH-regolato tra Glu 169 e His 222 nell'interfaccia di dimerizzazione del prodominio. Il residuo Arg 218 è sostanzialmente sepolto: esso forma un legame catione- $\pi$  con Tyr 171 e ponti salini attraverso l'interfaccia del dimero con residuo Asp 226 della regione "cravatta a farfalla" del complesso fattore di crescita prodominio (GPC). Inoltre, mutazioni di CED in Cys 223 e Cys 225 dimostrano l'importanza di legami disolfuro nella regione cravatta a farfalla per mantenere il TGF- $\beta$  nella forma inattiva. In

questa forma di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione comprendenti uno o più anticorpi inibitori servirebbero per alleviare i sintomi. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione sarebbe al soggetto neonato.

*Prodotti terapeutici per malattie e disordini immuni e autoimmuni*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per trattare disordini immuni ed autoimmuni. Tali disordini includono, ma non sono limitati a Encefalomielite Disseminata Acuta (ADEM), Leucoencefalite emorragica necrotizzante acuta, malattia di Addison, Agammaglobulinemia, Alopecia areata, Amiloidosi, Spondilite anchilosante, Nefrite anti-GBM/anti-TBM, Sindrome da antifosfolipidi (APS), Angioedema autoimmune, Anemia aplastica autoimmune, Disautonomia autoimmune, Epatite autoimmune, Iperlipidemia autoimmune, Immunodeficienza autoimmune, Malattia autoimmune dell'orecchio interno (AIED), miocardite autoimmune, pancreatite autoimmune, Retinopatia autoimmune, Porpora trombocitopenica autoimmune (ATP), Malattia della tiroide autoimmune, Orticaria autoimmune, Neuropatie assionali & neuronali, Malattia di Balò, Malattia di Behcet, Pemfigoide bolloso, Cardiomiopatia, Malattia di Castleman, Malattia celiaca, Malattia di Chagas, Sindrome da affaticamento cronico, Polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica (CIDP), Osteomielite multifocale ricorrente cronica (CRMO), sindrome di Churg-Strauss, Pemfigoide cicatriziale/pemfigoide benigno delle mucose, malattia di Crohn, sindrome di Cogans, Malattia da agglutinine a freddo, Blocco cardiaco congenito, Miocardite da Coxsackie, Malattia CREST, Crioglobulinemia mista essenziale, Neuropatie demielinizzanti, Dermatite erpetiforme, Dermatomiosite, Malattia di Devic (neuromielite ottica), Diabete Tipo I, Lupus discoide, Sindrome di Dressler, Endometriosi, Esofagite eosinofila, Fasciite eosinofila, Eritema nodoso, Encefalomielite allergica sperimentale, Sindrome di Evans, Fibromialgia, Alveolite fibrosante, Arterite a cellule giganti (arterite temporale), Glomerulonefrite, Sindrome di Goodpasture, Granulomatosi con Poliangerite (GPA) si veda quella di Wegener, Malattia di Graves, sindrome di Guillain-Barre, encefalite di Hashimoto, tiroidite di Hashimoto, Anemia emolitica, Porpora di Henoch-Schonlein, Herpes gestazionale, Iperammaglobulinemia, Porpora trombocitopenica idiopatica (ITP), Nefropatia da IgA, malattia sclerosante correlata alle IgG4, Lipoproteine immunoregatorie, Miosite da corpi di inclusione, Diabete Insulino-dipendente

(tipo1), Cistite interstiziale, Artrite giovanile, Diabete giovanile, Sindrome di Kawasaki, Sindrome di Lambert-Eaton, Vasculopatia dei Grandi Vasi, Vasculite leucocitoclastica, Lichen planus, Lichen sclerosus, Congiuntivite lignea, Malattia da IgA lineare (LAD), Lupus (SLE), malattia di Lyme, malattia di Meniere, cronica, poliangioite microscopica, Malattia mista del tessuto connettivo (MCTD), Ulcera di Mooren, Malattia di Mucha-Habermann, Sindromi di neoplasia endocrina multipla, Sclerosi multipla, Miosite, Miastenia grave, Narcolessia, Neuromielite ottica (di Devic), Neutropenia, Pemfigoide cicatriziale oculare, Neurite ottica, Reumatismo palindromico, PANDAS (Disordini Neuropsichiatrici Autoimmuni Pediatrici associati con Streptococco), Degenerazione cerebellare paraneoplastica, Emoglobinuria notturna parossistica (PNH), Sindrome di Parry Romberg, Sindrome di Parsonage-Turner, Pars planitis (uveite periferica), Pemfigo, Neuropatia periferica, Encefalomielite perivenosa, Anemia perniziosa, Sindrome POEMS, Poliarterite nodosa, Sindromi polighiandolari autoimmuni Tipo I, II, & III, Poliendocrinopatie, Polimialgia reumatica, Polimiosite, Sindrome post infarto miocardico, Sindrome postpericardiotomia, Dermatite da progesterone, Cirrosi biliare primaria, Colangite sclerosante primaria, Psoriasi, Artrite psoriasica, Fibrosi polmonare idiopatica, Pioderma gangrenoso, Aplasia pura dei Globuli Rossi, Fenomeno di Raynaud, Artrite Reattiva, Distrofia simpatica riflessa, sindrome di Reiter, Policondrite recidivante, Sindrome delle gambe senza riposo, Fibrosi retroperitoneale, Febbre reumatica, Artrite reumatoide, Sarcoidosi, Sindrome di Schmidt, Sclerite, Sclerodermia, Sindrome di Sjogren, Vasculopatia dei piccoli vasi, Autoimmunità dello sperma & dei testicoli, Sindrome della persona rigida, Endocardite batterica subacuta (SBE), Sindrome di Susac, Oftalmia simpatica, Arterite di Takayasu, Arterite temporale /Arterite a cellule giganti, Porpora trombocitopenica (TTP), Sindrome di Tolosa-Hunt, Mielite trasversa, Disordine autoimmune tubulare, Colite ulcerosa, Malattia del tessuto connettivo indifferenziato (UCTD), Uveite, Dermatosi vescicolo-bollosa, Vasculite, Vitiligine e Granulomatosi di Wegener (anche nota come Granulomatosi con poliangioite (GPA)).

Il TGF- $\beta$  svolge un ruolo attivo nella differenziazione, nella proliferazione e nell'attivazione dei leucociti rendendolo un importante fattore nelle malattie immuni ed autoimmuni. Inoltre, il TGF- $\beta$  promuove la chemiotassi dei leucociti ed influenza la localizzazione mediata da molecole di adesione. Un ruolo per TGF- $\beta$  nell'infiammazione cardiaca, polmonare e gastrica è stato dimostrato. Inoltre, topi deficienti per SMAD3 sono

inclinati alle infezioni croniche delle mucose come risultato di compromissione dell'attivazione delle cellule T e di ridotta immunità delle mucose (Blobe, G.C. et al., Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000 May 4;342(18):1350-8). Come immunosoppressore, è stato mostrato che TGF- $\beta$  inibisce la funzione delle cellule infiammatorie come pure potenzia la funzione delle cellule T regolatorie. Recenti studi hanno mostrato che il complesso fattore di crescita TGF- $\beta$  produttivo (GPC) latente si lega alle cellule T regolatorie attraverso un'interazione con la proteina anonima con ripetizioni della glicoproteina-A (GARP). Infatti, GARP è necessaria per l'associazione del TGF- $\beta$  con le cellule T (Tran, D.Q. et al., GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- $\beta$  on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *PNAS.* 2009. 106(32):13445-50). Tale interazione fornisce la piattaforma necessaria per rilasciare TGF- $\beta$  attivo dal GPC in un modo dipendente da integrina (Wang, R. et al., GARP regulates the bioavailability and activation of TGF- $\beta$ . *Mol Biol Cell.* 2012 Mar;23(6): 1129-39. Epub 2012 Jan 25). In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione modulano l'interazione tra GARP e TGF- $\beta$ . Tale modulazione può modulare selettivamente l'attività delle cellule T per il trattamento di malattia (ad es. malattia autoimmune e/o cancro). In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per il trattamento di disordini immuni e/o autoimmuni. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono specificamente prendere di mira GPC legato a GARP, GARP o il sito di interazione tra GARP e il GPC. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione comprendenti anticorpi sono progettati per promuovere rilascio di fattori di crescita (incluso, ma non limitato a TGF- $\beta$ ) da GPC legati a GARP nel contempo non influenzando il rilascio del fattore di crescita da GPC legati a LTBP. Il trattamento di disordini immuni ed autoimmuni con composti e/o composizioni della presente invenzione può essere in combinazione con standard di cura (SOC) o combinazioni sinergiche o con diagnostica di accompagnamento.

#### *Prodotti terapeutici per agenti infettivi*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere utili per il trattamento di malattie e/o disordini infettivi, ad esempio, in soggetti con una o più infezioni. In alcune forme di

realizzazione, i soggetti hanno una o più infezioni o sono a rischio di sviluppare una o più infezioni. Come usato nella presente, il termine "infezione" si riferisce a una malattia o una condizione in un ospite attribuibile alla presenza di uno o più organismi o agenti estranei in grado di riprodursi all'interno dell'ospite. Le infezioni tipicamente comprendono l'apertura di una breccia in una o più barriere di tessuto mucosale o altro normale da parte di uno o più organismi o agenti infettivi. Soggetti aventi una o più infezioni sono soggetti che comprendono uno o più organismi o agenti infettivi oggettivamente misurabili presenti nel loro corpo. Soggetti a rischio di avere una o più infezioni sono soggetti che sono predisposti a sviluppare una o più infezioni. Tali soggetti possono includere, ad esempio, soggetti con nota o sospetta esposizione a uno o più organismi o agenti infettivi. In alcune forme di realizzazione, soggetti a rischio di avere infezioni possono anche includere soggetti con condizioni associate con capacità compromesse di montare risposte immunitarie contro organismi e/o agenti infettivi, ad esempio, soggetti con immunodeficienza congenita e/o acquisita, soggetti sottoposti a radioterapia e/o a chemioterapia, soggetti con lesioni da ustione, soggetti con lesioni traumatiche e soggetti sottoposti a procedura chirurgica o a un'altra procedura medica o dentale invasiva.

Le infezioni sono a grandi linee classificate come batteriche, virali, fungine, e/o parassitiche sulla base della categoria di organismi e/o agenti infettivi coinvolti. Altri tipi meno comuni di infezione sono anche noti nella tecnica, incluse, ad es., infezioni che implicano rickettsiae, micoplasmi, ed agenti che causano la Scrapie, l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), e malattie da prioni (ad es., malattia di kuru e Creutzfeldt-Jacob). Esempi di batteri, virus, funghi, e parassiti che causano infezione sono ben noti nella tecnica. Un'infezione può essere acuta, subacuta, cronica, o latente, e può essere localizzata o sistemica. Come usato nella presente, il termine "infezione cronica" si riferisce a quelle infezioni che non sono eliminate dalle normali azioni delle risposte immunitarie innate o adattative e persistono nel soggetto per una lunga durata di tempo, nell'ordine di settimane, mesi, ed anni. Un'infezione cronica può riflettere latenza dell'agente infettivo, e può includere periodi in cui nessun sintomo infettivo è presente, cioè, periodi asintomatici. Esempi di infezioni croniche includono, ma non vi si limitano, infezione da HIV ed infezioni da herpesvirus. Inoltre, un'infezione può essere prevalentemente intracellulare o extracellulare durante almeno una fase del ciclo vitale dell'organismo o dell'agente infettivo

nell'ospite.

Composti e/o composizioni della presente invenzione ed agenti terapeutici aggiuntivi possono essere somministrati in combinazione nella stessa composizione (ad es., per via parenterale), come parte di una composizione separata o tramite un altro metodo descritto nella presente.

*Prodotti terapeutici per malattie, disordini e/o condizioni correlate agli occhi*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere utili nel trattamento di malattie, disordini e/o condizioni correlate agli occhi. Queste possono includere, ma non sono limitate a glaucoma, occhio secco e/o guarigione delle ferite della cornea. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni possono essere utili nel trattamento di glaucoma. Prove suggeriscono che TGF- $\beta$ 2 viene sovra-regolato nel glaucoma (Picht, G. et al., Transforming growth factor beta 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2001 Mar. 239(3):199-207; Tripathi, R.C. et al., Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF- $\beta$ 2. Exp Eye Res. 1994 Dec. 59(6):723-7.) Questo include glaucoma primario ad angolo aperto e glaucoma giovanile. Ci sono anche prove che TGF- $\beta$ 2 può indurre effetti senescenza-simili in cellule del reticolo trabecolare umano, che controllano la pressione intraoculare (spesso disfunzionale nel glaucoma) (Yu, A.L. et al., TGF- $\beta$ 2 induces senescence-associated changes in human trabecular meshwork cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov. 51(11): 5718-23.) In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per diminuire il rapporto di TGF- $\beta$ 2 libero a TGF- $\beta$ 2 legato a GPC (inattivo) in o intorno a tessuti dell'occhio interessati da o correlati a glaucoma. Le proteine correlate a TGF- $\beta$  possono anche avere effetto sulla guarigione delle ferite della cornea (ad es. dopo riparazione chirurgica e/o trattamento LASIK) (Huh, M.I. et al., Distribution of TGF- $\beta$  isoforms and signaling intermediates in corneal fibrotic wound repair. J Cell Biochem. 2009 Oct 1. 108(2): 476-88; Sumioka, T. et al., Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium. Mol Vis. 2008;14:2272-81. Epub 2008 Dec 11; Carrington, L.M. et al., Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF-beta isoforms and their inhibitors. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 May;47(5): 1886-94.) Composti e/o composizioni della presente invenzione

possono essere usati per modulare proteine correlate a TGF- $\beta$  nella cornea per permettere e/o potenziare la guarigione delle ferite. Tali composti e/o composizioni sarebbero benvenuti nel campo dove precedenti tentativi non hanno avuto successo. Mead et al (Mead, A.L. et al., Evaluation of anti-TGF-beta2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Aug;44(8):3394-401) hanno sviluppato anticorpi anti-TGF- $\beta$ 2 per prevenire la formazione di cicatrici nei tessuti oculari; tuttavia, i risultati delle sperimentazioni cliniche sono stati non conclusivi. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per modulare livelli di TGF- $\beta$ 2 (libero versus GPC-legato) fornendo così un metodo alternativo per approcciare una terapia anti-formazione di cicatrici.

*Prodotti terapeutici per indicazioni cardiovascolari*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per trattare una o più indicazioni cardiovascolari, includenti, ma non limitate a ipertrofia cardiaca. L'ipertrofia cardiaca comprende ingrossamento del cuore dovuto, tipicamente dovuto a aumentato volume cellulare delle cellule cardiache (Aurigemma 2006. N Engl J Med. 355(3):308-10.)

In alcune forme di realizzazione, composizioni dell'invenzione possono essere usate per trattare uno o più tipi di disordini arteriosi. Tali disordini possono includere, ma non sono limitati allo sviluppo di aneurismi aortici. Gli aneurismi aortici possono derivare da una varietà di cause, ma la maggior parte alla fine comportano la sovra-espressione di TGF- $\beta$ 2. Uno studio da Boileau et al (Boileau et al., Nature Genetics Letters. 2012. 44(8):916-23) ha scoperto mutazioni causative in TGF- $\beta$ 2 che sono state associate con alcune forme ereditarie di suscettibilità a malattia dell'aorta toracica. In modo interessante, sebbene le mutazioni siano state predette causare aploinsufficienza per TGF- $\beta$ 2, i tessuti aortici di individui con tali mutazioni comprendevano aumentati livelli di TGF- $\beta$ 2, come determinato mediante immunocolorazione. Simili scoperte sono state trovate in tessuti aortici da individui affetti da sindrome di Marfans (Nataatmadja et al., 2006.) In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per ridurre o impedire elevata segnalazione di TGF- $\beta$ 2 in tali casi limitando così lo sviluppo e/o la progressione di aneurismi.

In alcune forme di realizzazione, modelli animali possono essere usati per sviluppare e testare composti e/o

composizioni della presente invenzione per uso nel trattamento di malattie, disordini e/o condizioni cardiovascolari. In alcuni casi, possono essere usati modelli di danno vascolare. Tali modelli possono includere modelli di danno da palloncino. In alcuni casi, questi possono essere realizzati come descritto in Smith et al., 1999. Circ Res. 84(10):1212-22.

#### *Prodotti terapeutici per malattie, disordini e/o condizioni gastro-intestinali*

In alcune forme di realizzazione, composizioni dell'invenzione possono essere usate per trattare uno o più tipi di disordini gastro-intestinali (GI). Tali disordini possono includere, ma non sono limitati a una malattia infiammatoria intestinale (IBD) (ad es. malattia di Crohn e colite ulcerosa.)

TGF- $\beta$ 2 può svolgere un ruolo nell'omeostasi intestinale e può avere un ruolo anti-infiammatorio, proteggendo contro disordini correlati al GI quale la mucosite e certe forme di colite. In uno studio, è stato mostrato che il TGF- $\beta$ 2 sopprime le risposte infiammatorie dei macrofagi nell'intestino in via di sviluppo e protegge contro il danno infiammatorio alle mucose (Maheshwari et al., 2011.) In modo interessante, i livelli di TGF- $\beta$ 2 sono alti nel latte mammario, suggerendo che TGF- $\beta$ 2 può funzionare, in alcuni casi, per via topica. Infatti, TGF- $\beta$ 2 nel latte mammario può attenuare le risposte infiammatorie (Rautava et al., 2011.) Alcuni composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per modulare livelli e/o attività di TGF- $\beta$ 2 nel GI nel mantenimento dell'omeostasi e/o nella gestione di disordini correlati al GI.

In alcuni casi, modelli di malattie, disordini e/o condizioni correlati al GI, possono essere usati per sviluppare e/o testare composti e/o composizioni dell'invenzione per il trattamento di malattie, disordini e/o condizioni correlati al GI. In alcuni casi, possono essere usati modelli di danno al GI. Tali modelli di danno possono includere, ma non sono limitati a modelli di colite indotta da acido 2,4,6-trinitrobenzenesolfonico (TNBS). Tali modelli possono essere realizzati come descritto in Scheiffele, F. et al., 2002. Curr Protoc Immunol. Capitolo 15:Unità 15.19.

#### *Applicazioni veterinarie*

In alcune forme di realizzazione, è contemplato che composizioni dell'invenzione trovino utilità nell'area della cura veterinaria includente la cura e il trattamento di vertebrati non umani. Come descritto nella presente, il termine "vertebrato" include tutti i vertebrati includenti, ma non limitati a pesci, anfibi, uccelli, rettili e mammiferi

(inclusenti, ma non limitati a alpaca, banteng, bisonte, cammello, gatto, bovino, cervo, cane, asino, gayal, capra, porcellino d'india, cavallo, lama, topi, scimmie, mule, maiale, coniglio, ratti, renna, pecore bufalo d'acqua, yak ed esseri umani.) Come usato nella presente il termine "vertebrato non umano" si riferisce a qualunque vertebrato ad eccezione degli esseri umani (cioè Homo sapiens). I vertebrati non umani esemplari includono specie selvatiche e domestiche quali animali da compagnia e bestiame. Il bestiame include animali domestici allevati in un ambiente agricolo per produrre materiali quale cibo, manodopera, e prodotti derivati quali fibre e prodotti chimici. In generale, il bestiame include tutti i mammiferi, gli uccelli e i pesci aventi una potenziale significatività agricola. In particolare, animali da macello a quattro zampe includono manzi, giovenche, mucche, vitelli, tori, bovini, suini e pecore.

#### *Bioprocessamento*

In alcuni casi, la presente descrizione fornisce metodi per produrre uno o più prodotti biologici in cellule ospiti mettendo a contatto tali cellule con composti e/o composizioni della presente invenzione in grado di modulare l'espressione di geni bersaglio, o modificando il livello di molecole di segnalazione del fattore di crescita in cui tale modulazione o modificazione accresce la produzione di prodotti biologici. Secondo la presente invenzione, metodi di bioprocessamento possono essere migliorati utilizzando uno o più composti e/o composizioni della presente invenzione. Essi possono anche essere migliorati integrando, sostituendo o aggiungendo uno o più composti e/o composizioni.

#### *Composizioni farmaceutiche*

Le composizioni farmaceutiche descritte nella presente possono essere caratterizzate da uno o più di biodisponibilità, finestra terapeutica e/o volume di distribuzione.

#### *Biodisponibilità*

In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche comprendono complessi di composti e/o composizioni della presente descrizione con i GPC. In tali forme di realizzazione, i complessi possono essere impiantati in siti terapeutici desiderati dove una dissociazione continua di fattori di crescita dai complessi può verificarsi su un periodo di tempo desiderato. In alcune forme di realizzazione, i complessi impiantati possono essere realizzati in associazione

con matrici simili a spugne e/o a osso. Tali impianti possono includere, ma non sono limitati a siti di impianti dentali e/o siti di riparazione ossea.

In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente descrizione sono prodotti in cellule deficienti per furina. GPC prodotti in tali cellule possono essere utili per il trattamento in aree dove il rilascio viene rallentato per via del fatto che il clivaggio tramite furina in vivo è limitante il tasso durante il processamento di GPC. In alcuni casi, uno o più siti per tollioide e/o furina nei GPC sono mutati, rallentando l'azione di proteasi endogene tollioide e/o furina. In tali casi, il rilascio del fattore di crescita può essere rallentato (ad es. nei siti di impianto.)

Gli anticorpi della presente invenzione, quando formulati in composizioni con agenti di veicolazione/formulazione o veicoli come descritto nella presente, possono esibire aumentata biodisponibilità rispetto a composizioni mancanti di agenti di veicolazione come descritti nella presente. Come usato nella presente, il termine "biodisponibilità" si riferisce alla disponibilità sistemica di una data quantità di un particolare agente somministrato a un soggetto. La biodisponibilità può essere valutata misurando l'area sottesa alla curva (AUC) o la massima concentrazione sierica o plasmatica ( $C_{max}$ ) della forma invariata di un composto dopo somministrazione del composto a un mammifero. L'AUC è una determinazione dell'area sottesa alla curva che grafica la concentrazione sierica o plasmatica di un composto lungo l'ordinata (asse y) contro il tempo lungo l'ascissa (asse x). In generale, l'AUC per un particolare composto può essere calcolata utilizzando metodi noti a quelli di ordinaria esperienza nella tecnica e come descritto in G. S. Banker, *Modern Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, v. 72, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996.

I valori di  $C_{max}$  sono le concentrazioni massime di composti ottenute nel siero o nel plasma di un soggetto dopo somministrazione dei composti al soggetto. I valori di  $C_{max}$  di particolari composti possono essere misurati utilizzando metodi noti a quelli di ordinaria esperienza nella tecnica. Come usato nella presente, le frasi "aumentare la biodisponibilità" o "migliorare la farmacocinetica", si riferiscono a azioni che possono aumentare la disponibilità sistemica di composti e/o composizioni della presente invenzione (come misurato da AUC,  $C_{max}$ , o  $C_{min}$ ) in un soggetto. In alcune forme di realizzazione, tali azioni possono comprendere co-somministrazione con uno o più agenti di veicolazione come descritto nella presente. In alcune forme di realizzazione, la biodisponibilità di

composti e/o composizioni può aumentare di almeno circa 2%, almeno circa 5%, almeno circa 10%, almeno circa 15%, almeno circa 20%, almeno circa 25%, almeno circa 30%, almeno circa 35%, almeno circa 40%, almeno circa 45%, almeno circa 50%, almeno circa 55%, almeno circa 60%, almeno circa 65%, almeno circa 70%, almeno circa 75%, almeno circa 80%, almeno circa 85%, almeno circa 90%, almeno circa 95% o circa 100%.

#### *Finestra terapeutica*

Composti e/o composizioni della presente invenzione, quando formulati con uno o più agenti di veicolazione come descritto nella presente, possono esibire aumenti nella finestra terapeutica di somministrazione dei composti e/o delle composizioni rispetto alla finestra terapeutica dei composti e/o delle composizioni somministrati senza uno o più agenti di veicolazione come descritto nella presente. Come usato nella presente, il termine "finestra terapeutica" si riferisce al range di concentrazioni plasmatiche, o il range di livelli di sostanza terapeuticamente attiva nel sito di azione, con un'alta probabilità di suscitare un effetto terapeutico. In alcune forme di realizzazione, le finestre terapeutiche di composti e/o composizioni quando co-somministrati con uno o più agenti di veicolazione come descritto nella presente possono aumentare di almeno circa 2%, almeno circa 5%, almeno circa 10%, almeno circa 15%, almeno circa 20%, almeno circa 25%, almeno circa 30%, almeno circa 35%, almeno circa 40%, almeno circa 45%, almeno circa 50%, almeno circa 55%, almeno circa 60%, almeno circa 65%, almeno circa 70%, almeno circa 75%, almeno circa 80%, almeno circa 85%, almeno circa 90%, almeno circa 95% o circa 100%.

#### *Volume di distribuzione*

Composti e/o composizioni della presente invenzione, quando formulati con uno o più agenti di veicolazione come descritto nella presente, possono esibire un volume di distribuzione ( $V_{\text{dist}}$ ) migliorato, ad es., ridotto o mirato, rispetto a formulazioni mancanti di uno o più agenti di veicolazione come descritto nella presente.  $V_{\text{dist}}$  riguarda la quantità di un agente nel corpo alla concentrazione dello stesso agente nel sangue o nel plasma. Come usato nella presente, il termine "volume di distribuzione" si riferisce al volume di fluido che sarebbe richiesto per contenere la quantità totale di un agente nel corpo alla stessa concentrazione come nel sangue o nel plasma: il  $V_{\text{dist}}$  è uguale alla quantità di un agente nel corpo/concentrazione dell'agente nel sangue o nel plasma. Ad esempio, per una dose di 10 mg di un dato agente e una concentrazione plasmatica di 10 mg/L, il volume di distribuzione

sarebbe 1 litro. Il volume di distribuzione riflette il grado al quale un agente è presente nel tessuto extravascolare. Grandi volumi di distribuzione riflettono la tendenza degli agenti di legarsi ai componenti tissutali rispetto alle proteine plasmatiche. In ambito clinico, il  $V_{\text{dist}}$  può essere usato per determinare le dosi di carico per ottenere concentrazioni allo stato stazionario. In alcune forme di realizzazione, i volumi di distribuzione di composti e/o composizioni della presente invenzione quando co-somministrati con uno o più agenti di veicolazione come descritto nella presente possono diminuire di almeno circa 2%, almeno circa 5%, almeno circa 10%, almeno circa 15%, almeno circa 20%, almeno circa 25%, almeno circa 30%, almeno circa 35%, almeno circa 40%, almeno circa 45%, almeno circa 50%, almeno circa 55%, almeno circa 60%, almeno circa 65%, almeno circa 70%.

*Formulazione, somministrazione, veicolazione e dosaggio*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono composizioni farmaceutiche. Come usato nella presente, il termine "composizione farmaceutica" si riferisce a un composto e/o una composizione della presente invenzione che è stato/a formulato/a con uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili. In alcune forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche possono facoltativamente comprendere una o più sostanze supplementari attive, ad esempio sostanze terapeuticamente e/o profilatticamente attive. Considerazioni generali nella formulazione e/o nella produzione di agenti farmaceutici si possono trovare, ad esempio, in Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (incorporato nella presente per riferimento).

In alcune forme di realizzazione, le composizioni possono essere somministrate a esseri umani, pazienti o soggetti umani. Ai fini della presente descrizione, la frase "ingrediente attivo" generalmente si riferisce a composti e/o composizioni della presente invenzione da veicolare come descritto nella presente.

Sebbene le descrizioni delle composizioni farmaceutiche fornite nella presente siano principalmente dirette a composizioni farmaceutiche che sono adatte per somministrazione agli esseri umani, sarà compreso dal tecnico esperto che tali composizioni sono in generale adatte per la somministrazione a altri soggetti, ad es., a animali non umani, ad es. mammiferi non umani. La modificazione di composizioni farmaceutiche adatte per la somministrazione agli esseri umani al fine di rendere le composizioni adatte per la somministrazione ai vari animali

è ben conosciuta, e il farmacologo veterinario comunemente esperto può progettare e/o compiere tale modificazione con una sperimentazione di pura routine, se presente. Soggetti per i quali è contemplata la somministrazione di composizioni farmaceutiche includono, ma non vi si limitano, esseri umani e/o altri primati; mammiferi, includenti mammiferi rilevanti dal punto di vista commerciale quali bovini, maiali, cavalli, pecore, gatti, cani, topi, e/o ratti; e/o uccelli, includenti uccelli rilevanti dal punto di vista commerciale quali pollame, polli, anatre, oche, e/o tacchini.

In alcune forme di realizzazione, formulazioni delle composizioni farmaceutiche descritte nella presente possono essere preparate tramite qualunque metodo noto o di qui in avanti sviluppato nella tecnica di farmacologia. In generale, tali metodi preparatori includono il passo di portare gli ingredienti attivi in associazione con eccipienti e/o con uno o più altri ingredienti accessori, e poi, se necessario e/o desiderabile, suddividere, formare e/o confezionare i prodotti in unità singole o multidose desiderate.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono essere preparate, confezionate, e/o vendute in bulk, come singole dosi unitarie, e/o come una pluralità di singole dosi unitarie. Come usato nella presente, il termine "dose unitaria" si riferisce a una quantità discreta della composizione farmaceutica comprendente una quantità predeterminata di ingrediente attivo. Le quantità di ingrediente attivo sono generalmente uguali al dosaggio degli ingredienti attivi che sarebbe somministrato ai soggetti e/o a frazioni opportune di tali dosaggi quale, ad esempio, la metà o un terzo di tali dosaggi.

In alcune forme di realizzazione, le quantità relative di ingredienti attivi, eccipienti farmaceuticamente accettabili, e/o qualunque ingrediente aggiuntivo nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono variare, a seconda dell'identità, della dimensione, e/o della condizione dei soggetti da trattare ed inoltre a seconda delle vie tramite le quali le composizioni sono da somministrare. A titolo di esempio, le composizioni possono comprendere tra circa 0.1% e 100%, ad esempio, da circa 0.5% a circa 50%, da circa 1% a circa 30%, da circa 5% a circa 80% o almeno 80% (p/p) di ingrediente attivo. In alcune forme di realizzazione, gli ingredienti attivi sono anticorpi diretti verso elementi regolatori e/o GPC.

*Formulazioni*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere formulati utilizzando uno o più eccipienti per: (1) aumentare la stabilità; (2) aumentare la permeabilità cellulare; (3) permettere il rilascio sostenuto o ritardato (ad es., di composti e/o fattori di crescita da tali formulazioni); e/o (4) modificare la biodistribuzione (ad es., direzionare i composti a specifici tessuti o tipi cellulari). Oltre agli eccipienti tradizionali quali tutti i solventi, mezzi di dispersione, diluenti, veicoli liquidi, coadiuvanti di dispersione, coadiuvanti di sospensione, agenti tensioattivi, agenti isotonici, agenti addensanti, agenti emulsionanti e preservanti, le formulazioni della presente invenzione possono comprendere, senza limitazione, liposomi, nanoparticelle lipidiche, polimeri, lipoplessi, nanoparticelle nucleo-guscio, peptidi, proteine, cellule trasfettate con i composti e/o le composizioni della presente invenzione (ad es., per il trapianto nei soggetti) e combinazioni degli stessi.

#### *Eccipienti*

Vari eccipienti per formulare le composizioni farmaceutiche e metodiche per preparare la composizione sono noti nella tecnica (si veda Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> Edizione, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; incorporato nella presente per riferimento).

In alcune forme di realizzazione, l'uso di mezzi eccipienti convenzionali è contemplato nell'ambito della presente descrizione, eccetto nella misura in cui qualunque mezzo eccipiente convenzionale possa essere incompatibile con sostanze e/o loro derivati, come ad esempio producendo qualunque effetto biologico indesiderabile o altrimenti interagendo in modi deleteri con qualunque altro componente delle composizioni farmaceutiche.

Formulazioni delle composizioni farmaceutiche descritte nella presente possono essere preparate tramite qualunque metodo noto o di qui in avanti sviluppato nella tecnica di farmacologia. In generale, tali metodi preparatori includono passi di associare ingredienti attivi con eccipienti e/o altri ingredienti accessori.

Composizioni farmaceutiche, in accordo con la presente descrizione, possono essere preparate, confezionate, e/o vendute in bulk, come singole dosi unitarie, e/o come una pluralità di singole dosi unitarie.

Quantità relative di ingredienti attivi, eccipienti farmaceuticamente accettabili, e/o ingredienti aggiuntivi in composizioni farmaceutiche della presente descrizione possono variare, a seconda dell'identità, della dimensione, e/o della condizione dei soggetti che vengono trattati e inoltre a seconda delle vie tramite le quali le composizioni

farmaceutiche possono essere somministrate.

In alcune forme di realizzazione, gli eccipienti farmaceuticamente accettabili sono almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99% o il 100% puri. In alcune forme di realizzazione, gli eccipienti sono approvati per uso negli esseri umani e/o per uso veterinario. In alcune forme di realizzazione, gli eccipienti sono approvati dalla FDA degli Stati Uniti. In alcune forme di realizzazione, gli eccipienti sono di grado farmaceutico. In alcune forme di realizzazione, gli eccipienti soddisfano gli standard della Farmacopea Statunitense (USP), della Farmacopea Europea (EP), della Farmacopea Britannica, e/o della Farmacopea Internazionale.

In alcune forme di realizzazione, gli eccipienti farmaceuticamente accettabili della presente invenzione possono includere, ma non sono limitati a, diluenti inerti, agenti disperdenti e/o granulanti, agenti tensioattivi e/o emulsionanti, agenti disgreganti, agenti leganti, preservanti, agenti tamponanti, agenti lubrificanti, e/o oli. Tali eccipienti possono facoltativamente essere inclusi nelle composizioni farmaceutiche.

Diluenti esemplari includono, ma non vi si limitano, calcio carbonato, sodio carbonato, calcio fosfato, dicalcio fosfato, calcio solfato, calcio idrogeno fosfato, sodio fosfato lattosio, saccarosio, cellulosa, cellulosa microcristallina, caolino, mannitolo, sorbitolo, inositolo, sodio cloruro, amido essiccato, amido di mais, zucchero in polvere, *etc.*, e/o combinazioni degli stessi.

Agenti granulanti e/o disperdenti esemplari includono, ma non vi si limitano, amido di patata, amido di mais, amido di tapioca, sodio amido glicolato, argille, acido alginico, gomma di guar, polpa di agrume, agar, bentonite, cellulosa e prodotti del legno, spugna naturale, resine a scambio cationico, calcio carbonato, silicati, sodio carbonato, poli(vinil-pirrolidone) reticolato (crospovidone), sodio carbossimetilamido (sodio amido glicolato), carbossimetilcellulosa, carbossimetilcellulosa sodica reticolata (croscarmellosa), metilcellulosa, amido pregelatinizzato (amido 1500), amido microcristallino, amido insolubile in acqua, calcio carbossimetilcellulosa, magnesio alluminio silicato (VEEGUM®), sodio lauril solfato, composti di ammonio quaternario, *etc.*, e/o combinazioni degli stessi.

Agenti tensioattivi e/o emulsionanti esemplari includono, ma non vi si limitano, emulsionanti naturali (ad es. acacia, agar, acido alginico, sodio alginato, tragacanth, chondrus, colesterolo, xanthan, pectina, gelatina, tuorlo

d'uovo, caseina, lanolina grezza, colesterolo, cera, e lecitina), argille colloidali (ad es. bentonite [alluminio silicato] e VEEGUM® [magnesio alluminio silicato]), derivati di amminoacidi a catena lunga, alcoli ad alto peso molecolare (ad es. alcol stearilico, alcol cetilico, alcol oleilico, triacetina monostearato, etilene glicole distearato, gliceril monostearato, e propilene glicole monostearato, alcol polivinilico), carbomeri (ad es. carbossi polimetilene, poliacido acrilico, polimero di acido acrilico, e polimero carbossivinilico), carragenina, derivati cellulosici (ad es. carbossimetilcellulosa sodica, cellulosa polverizzata, idrossimetilcellulosa, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, metilcellulosa), esteri del sorbitano con gli acidi grassi (ad es. poliossietilene sorbitano monolaurato [TWEEN®20], poliossietilene sorbitano [TWEENn®60], poliossietilene sorbitan monooleato [TWEEN®80], sorbitan monopalmitato [SPAN®40], sorbitan monostearato [Span®60], sorbitan tristearato [Span®65], gliceril monooleato, sorbitan monooleato [SPAN®80]), poliossietilene esteri (ad es. poliossietilene monostearato [MYRJ®45], poliossietilene olio di ricino idrogenato, olio di ricino polietossilato, poliossietilene stearato, e SOLUTOL®), esteri del saccarosio con acidi grassi, polietilenglicole esteri con acidi grassi (ad es. CREMOPHOR®), poliossietilene eteri, (ad es. poliossietilene lauril etere [BRIJ®30]), poli(vinilpirrolidone), dietilene glicole monolaurato, trietanolammina oleato, sodio oleato, potassio oleato, etile oleato, acido oleico, etile laurato, sodio lauril solfato, PLUORINC®F 68, POLOXAMER®188, cetrimonio bromuro, cetilpiridinio cloruro, benzalconio cloruro, docusato sodio, etc. e/o combinazioni degli stessi.

Agenti leganti esemplari includono, ma non vi si limitano, amido (ad es. amido di mais e pasta d'amido); gelatina; zuccheri (ad es. saccarosio, glucosio, destrosio, destrina, molasse, lattosio, lattitolo, mannitolo); gomme naturali e sintetiche (ad es. acacia, sodio alginato, estratto di muschio irlandese, gomma di Panwar, gomma di Ghatti, mucillagine di bucce di Psyllium, carbossimetilcellulosa, metilcellulosa, etilcellulosa, idrossietilcellulosa, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, cellulosa microcristallina, acetato di cellulosa, poli(vinilpirrolidone), magnesio alluminio silicato (Veegum®), e arabogalattano del larice); alginati; polietilene ossido; polietilenglicole; sali di calcio inorganici; acido silicico; polimetacrilati; cere; acqua; alcol; *etc.*; e combinazioni degli stessi.

Preservanti esemplari possono includere, ma non sono limitati a, antiossidanti, agenti chelanti, preservanti

antimicrobici, preservanti antifungini, preservanti alcolici, preservanti acidi, e/o altri preservanti. Antiossidanti esemplari includono, ma non vi si limitano, alfa tocoferolo, acido ascorbico, ascorbile palmitato, idrossianisolo butilato, idrossitoluene butilato, monotioglicerolo, potassio metabisolfito, acido propionico, propile gallato, sodio ascorbato, sodio bisolfito, sodio metabisolfito, e/o sodio solfito. Agenti chelanti esemplari includono acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), acido citrico monoidrato, disodio edetato, dipotassio edetato, acido edetico, acido fumarico, acido malico, acido fosforico, sodio edetato, acido tartarico, e/o trisodio edetato. Preservanti antimicrobici esemplari includono, ma non vi si limitano, benzalconio cloruro, benzetonio cloruro, alcol benzilico, bronopol, cetrimide, cetilpiridinio cloruro, clorexidina, clorobutanolo, clorocresolo, cloroxilenolo, cresolo, alcol etilico, glicerina, esetidina, imidurea, fenolo, fenossietanolo, alcol feniletilico, fenilmercurico nitrato, propilene glicole, e/o thimerosal. Preservanti antifungini esemplari includono, ma non vi si limitano, butilparaben, metilparaben, etilparaben, propilparaben, acido benzoico, acido idrossibenzoico, potassio benzoato, potassio sorbato, sodio benzoato, sodio propionato, e/o acido sorbico. Preservanti alcolici esemplari includono, ma non vi si limitano, etanolo, polietilenglicole, fenolo, composti fenolici, bisfenolo, clorobutanolo, idrossibenzoato, e/o alcol feniletilico. Preservanti acidi esemplari includono, ma non vi si limitano, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-carotene, acido citrico, acido acetico, acido deidroacetico, acido ascorbico, acido sorbico, e/o acido fitico. Altri preservanti includono, ma non vi si limitano, tocoferolo, tocoferolo acetato, deterossima mesilato, cetrimide, idrossianisolo butilato (BHA), idrossitoluenato butilato (BHT), etilenediammina, sodio lauril solfato (SLS), sodio lauril etere solfato (SLES), sodio bisolfito, sodio metabisolfito, potassio solfito, potassio metabisolfito, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, metilparaben, GERMALL®115, GERMABEN®II, NEOLONE™, KATHON™, e/o EUXYL®.

Agenti tamponanti esemplari includono, ma non vi si limitano, soluzioni di tampone citrato, soluzioni di tampone acetato, soluzioni di tampone fosfato, ammonio cloruro, calcio carbonato, calcio cloruro, calcio citrato, calcio gluconato, calcio gluceptato, calcio gluconato, acido D-gluconico, calcio glicerofosfato, calcio lattato, acido propanoico, calcio levulinato, acido pentanoico, calcio fosfato dibasico, acido fosforico, calcio fosfato tribasico, calcio fosfato idrossido, potassio acetato, potassio cloruro, potassio gluconato, miscele di potassio, potassio fosfato

dibasico, potassio fosfato monobasico, miscele di potassio fosfato, sodio acetato, sodio bicarbonato, sodio cloruro, sodio citrato, sodio lattato, sodio fosfato dibasico, sodio fosfato monobasico, miscele di sodio fosfato, trometamina, idrossido di magnesio, idrossido di alluminio, acido alginico, acqua senza pirogeni, soluzione salina isotonica, soluzione di Ringer, alcol etilico, *etc.*, e/o combinazioni degli stessi.

Agenti lubrificanti esemplari includono, ma non vi si limitano, magnesio stearato, calcio stearato, acido stearico, silice, talco, malto, gliceril beanato, oli vegetali idrogenati, polietilenglicole, sodio benzoato, sodio acetato, sodio cloruro, leucina, magnesio lauril solfato, sodio lauril solfato, *etc.*, e combinazioni degli stessi.

Oli esemplari includono, ma non vi si limitano, oli di mandorla, nocciolo di albicocca, avocado, babassu, bergamotto, semi di ribes nero, borragine, cade, camomilla, canola, carvi, carnauba, ricino, cannella, burro di cacao, noce di cocco, fegato di merluzzo, caffè, mais, semi di cotone, emu, eucalipto, enotera, pesce, semi di lino, geraniolo, zucca, semi di chicco d'uva, nocciola, issopo, isopropile miristato, jojoba, noce di kukui, lavandino, lavanda, limone, litsea cubeba, noce di macadamia, malva, semi di mango, semi di meadowfoam, visone, noce moscata, oliva, arancia, arancia rugosa, palma, palmisto, nocciolo di pesca, arachide, semi di papavero, semi di zucca, colza, crusca di riso, rosmarino, cartamo, sandalo, sasquana, saporito, olivello spinoso di mare, sesamo, burro di karité, silicone, soia, girasole, albero del tè, cardo, camelia del Giappone, vetiver, noce, e germe di grano.

Oli esemplari includono, ma non vi si limitano, butile stearato, trigliceride caprilico, trigliceride caprico, ciclometicone, dietile sebacato, dimeticone 360, isopropile miristato, olio minerale, ottildodecanolo, alcol oleilico, olio di silicone, e/o combinazioni degli stessi.

Eccipienti quali burro di cacao e cere per supposte, agenti coloranti, agenti di rivestimento, agenti dolcificanti, aromatizzanti, e/o profumanti possono essere presenti nella composizione, secondo il giudizio del formulatore.

*Veicoli di formulazione: liposomi, lipoplessi, e nanoparticelle lipidiche*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere formulati utilizzando uno o più liposomi, lipoplessi e/o nanoparticelle lipidiche. In alcune forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche comprendono i liposomi. I liposomi sono vescicole preparate artificialmente che possono essere composte principalmente da un doppio strato lipidico e possono essere usati come veicoli per veicolazione per la

somministrazione di nutrienti e formulazioni farmaceutiche. I liposomi possono essere di dimensioni diverse quali, ma non limitate a, vescicole multilamellari (MLV) che possono avere un diametro di centinaia di nanometri e possono contenere una serie di bistrati concentrici separati da stretti compartimenti acquosi, piccole vescicole unicellulari (SUV) che possono essere più piccole di 50 nm in diametro e grandi vescicole unilamellari (LUV) che possono essere tra 50 e 500 nm in diametro. I componenti dei liposomi possono includere, ma non sono limitati a, opsonine o ligandi al fine di migliorare l'attacco dei liposomi al tessuto malato o attivare eventi quali, ma non limitati a, endocitosi. I liposomi possono comprendere basso o alto pH. In alcune forme di realizzazione, il pH del liposoma può essere variato al fine di migliorare la veicolazione delle formulazioni farmaceutiche.

In alcune forme di realizzazione, la formazione dei liposomi può dipendere da caratteristiche fisicochimiche quali, ma non limitate a, la formulazione farmaceutica intrappolata, gli ingredienti liposomiali, la natura del mezzo in cui le vescicole lipidiche sono disperse, l'effettiva concentrazione delle sostanze intrappolate, la potenziale tossicità delle sostanze intrappolate, processi aggiuntivi implicati durante l'applicazione e/o la veicolazione delle vescicole, la dimensione di ottimizzazione, la polidispersità, la durata di conservazione delle vescicole per l'applicazione voluta, la riproducibilità batch-a-batch e la possibilità di produzione su larga scala di prodotti liposomiali sicuri ed efficienti.

In alcune forme di realizzazione, le formulazioni possono essere assemblate o le composizioni modificate in modo tale che siano passivamente o attivamente dirette a diversi tipi cellulari *in vivo*.

In alcune forme di realizzazione, le formulazioni possono essere selettivamente direzionate attraverso l'espressione di diversi ligandi sulle superfici di formulazione come esemplificato da, ma non limitato da, folato, transferrina, N-acetilgalattosammina (GalNAc), e approcci direzionati da anticorpo.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono essere formulate con liposomi, lipoplessi e/o nanoparticelle lipidiche per migliorare l'efficacia della funzione. Tali formulazioni possono essere capaci di aumentare la trasfezione delle cellule da parte delle composizioni farmaceutiche. In alcune forme di realizzazione, liposomi, lipoplessi, o nanoparticelle lipidiche possono essere usati per aumentare la stabilità della composizione farmaceutica.

In alcune forme di realizzazione, i liposomi sono formulati specificamente per composizioni farmaceutiche comprendenti uno o più anticorpi. Tali liposomi possono essere preparati secondo metodiche note nella tecnica, quali quelle descritte da Eppstein et al. (Eppstein, D.A. et al., Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1985 Jun;82(11):3688-92); Hwang et al. (Hwang, K.J. et al., Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Jul;77(7):4030-4); US 4,485,045 e US 4,544,545. La produzione di liposomi con tempo di circolazione sostenuto è anche descritta in US 5,013,556.

In alcune forme di realizzazione, i liposomi della presente invenzione comprendenti anticorpi possono essere generati utilizzando evaporazione in fase inversa utilizzando lipidi quale fosfatidilcolina, colesterolo come pure fosfatidiletanolamina che sono stati derivatizzati con polietilenglicole. Filtri con una dimensione dei pori definita sono usati per estrarre i liposomi del diametro desiderato. In un'altra forma di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere coniugati alle superfici esterne dei liposomi tramite reazioni di interscambio di disolfuro come è descritto da Martin et al. (Martin, F.J. et al., Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. J Biol Chem. 1982 Jan 10;257(1):286-8).

*Veicoli di formulazione: polimeri e nanoparticelle*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere formulati utilizzando polimeri naturali e/o sintetici. Esempi non limitanti di polimeri che possono essere usati per la veicolazione includono, ma non sono limitati a DMRI/DOPE, poloxamero, chitosano, ciclodestrina, e polimeri poli(acido lattico-co-glicolico) (PLGA).

In alcune forme di realizzazione, i polimeri possono essere biodegradabili.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione con polimeri può permettere rilascio sostenuto e/o ritardato di composti e/o composizioni (ad es., dopo iniezione intramuscolare e/o sottocutanea). Un profilo di rilascio modificato per composti e/o composizioni della presente invenzione può dare come risultato, ad esempio, rilascio di composto su un periodo di tempo esteso. Le formulazioni con polimeri possono anche essere usate per aumentare la stabilità di composti e/o composizioni della presente invenzione.

In alcune forme di realizzazione, le formulazioni con polimeri possono essere selettivamente direzionate attraverso l'espressione di ligandi diversi come esemplificato da, ma non limitato da, folato, transferrina, e N-acetilgalattosammina (GalNAc) (Benoit, D.S. et al., Synthesis of folate-functionalized RAFT polymers for targeted siRNA delivery. *Biomacromolecules*. 2011 12:2708-14; Rozema, D.B. et al., Dynamic polyconjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 104:12982-12887; Davis, M.E. et al., The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol Pharm*. 2009 6:659-668; Davis, M.E. et al., Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. 2010. 464:1067-70)

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere formulati come nanoparticelle utilizzando combinazioni di polimeri, lipidi, e/o altri agenti biodegradabili, quali, ma non limitati a, calcio fosfati. In alcune forme di realizzazione, i componenti possono essere combinati in nucleo-gusci, ibridi, e/o architetture strato-dopo-strato, per consentire un fine aggiustamento della struttura della nanoparticella, così la veicolazione può essere potenziata. Per gli anticorpi della presente invenzione, possono essere usati sistemi basati su poli(2-(metacriloilossi)etile fosforilcolina)-blocco-(2-(diisopropilammino)etile metacrilato), (PMPC-PDPA), un copolimero diblocco sensibile al pH che si auto-assembla per formare vescicole di dimensione nanometrica, anche noti come polimeriomi, a pH fisiologico. È stato mostrato che questi polimeriomi veicolano con successo carichi utili di anticorpo relativamente alti all'interno di cellule vive. (Massignani, M. et al., Cellular delivery of antibodies: effective targeted subcellular imaging and new therapeutic tool. *Nature Proceedings*. 2010. p1-17.)

In alcune forme di realizzazione, PEG-polimeri a conversione di carica (Pitella, F. et al., Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials*. 2011 32:3106-14) possono essere usati per formare le nanoparticelle per la veicolazione di composti e/o composizioni della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, PEG-polimeri a conversione di carica possono migliorare copolimeri a blocchi PEG-polianione essendo clivati in policationi a pH acido, accrescendo così l'evasione endosomiale.

In alcune forme di realizzazione, complessazione, veicolazione e/o internalizzazione di nanoparticelle polimeriche

possono essere controllate precisamente modificando le composizioni chimiche in entrambi i componenti delle nanoparticelle nucleo e guscio (Siegwart, D.J. et al., Combinatorial synthesis of chemically diverse core-shell nanoparticles for intracellular delivery. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108:12996-3001).

In alcune forme di realizzazione, matrici di poli(etilene-co-vinile acetato), sono usate per veicolare composti e/o composizioni dell'invenzione. Tali matrici sono state descritte da altri (Sherwood, J.K. et al., Controlled antibody delivery systems. Nature Biotechnology. 1992. 10:1446-9.)

#### *Formulazioni degli anticorpi*

Gli anticorpi della presente invenzione possono essere formulati per somministrazione endovenosa o somministrazione extravascolare (Daugherty, et al., Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. Adv Drug Deliv Rev. 2006 Aug 7;58(5-6):686-706 e pubblicazione della domanda di brevetto degli Stati Uniti numero US2011/0135570). Vie di somministrazione extravascolare possono includere, ma non sono limitate a somministrazione sottocutanea, somministrazione intraperitoneale, somministrazione intracerebrale, somministrazione intraoculare, somministrazione intralesionale, somministrazione topica e somministrazione intramuscolare.

In alcune forme di realizzazione, le strutture degli anticorpi possono essere modificate per migliorare l'efficacia come prodotti terapeutici. I miglioramenti possono includere, ma non sono limitati a migliorata stabilità termodinamica, ridotte proprietà di legame al recettore Fc e/o migliorata efficienza di ripiegamento. Le modificazioni possono includere, ma non sono limitate a sostituzioni amminoacidiche, glicosilazione, palmitoilazione e/o coniugazione di proteina.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere formulati con antiossidanti per ridurre l'ossidazione degli anticorpi. Gli anticorpi della presente invenzione possono anche essere formulati con additivi per ridurre l'aggregazione proteica. Tali additivi possono includere, ma non sono limitati a albumina, amminoacidi, zuccheri, urea, cloruro guanidinio, polialcoli, polimeri (quali polietilenglicole e destrani), tensioattivi (includenti, ma non limitati a polisorbato 20 e polisorbato 80) o anche altri anticorpi.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere formulati per ridurre

l'effetto dell'acqua sulla struttura e sulla funzione dell'anticorpo. Le preparazioni degli anticorpi in tali formulazioni possono essere liofilizzate. Formulazioni sottoposte alla liofilizzazione possono includere carboidrati o composti poliolo per proteggere e/o stabilizzare la struttura dell'anticorpo. Tali composti possono includere, ma non sono limitati a saccarosio, trealosio e mannitolo.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere formulati con polimeri. In alcune forme di realizzazione, formulazioni con polimeri possono comprendere polimeri idrofobi. Tali polimeri possono essere microsfeere formulate con polilattide-co-glicolide attraverso metodi di incapsulamento solido-in-olio-in-acqua. In alcune forme di realizzazione, microsfeere comprendenti copolimero etilenevinile acetato possono anche essere usate per la veicolazione degli anticorpi e/o per estendere la durata di tempo del rilascio di anticorpo nei siti di veicolazione. In alcune forme di realizzazione, i polimeri possono essere gel acquosi. Tali gel possono, ad esempio, comprendere carbossimetilcellulosa. In alcune forme di realizzazione, i gel acquosi possono anche comprendere idrogeli di acido ialuronico. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi possono essere covalentemente legati a tali gel attraverso legami idrazone che consentono veicolazione sostenuta nei tessuti, includenti ma non limitati a tessuti del sistema nervoso centrale.

*Veicoli di formulazione: peptidi e proteine*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere formulati con peptidi e/o proteine. In alcune forme di realizzazione, peptidi quali, ma non limitati a, peptidi penetranti nelle cellule e/o proteine/peptidi che permettono la veicolazione intracellulare possono essere usati per veicolare le formulazioni farmaceutiche. Esempi non limitanti di peptidi penetranti nelle cellule che possono essere usati con formulazioni farmaceutiche della presente invenzione includono sequenze peptidiche penetranti nelle cellule attaccate a policationi che facilitano la veicolazione allo spazio intracellulare, ad es., peptide TAT derivato da HIV, penetratine, transportan, o peptidi penetranti nelle cellule derivati da hCT (si veda, ad esempio Caron, N.J. et al., Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells. *Mol Ther.* 2001. 3(3):310-8; Langel, U., *Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications*, CRC Press, Boca Raton FL, 2002; El-Andalousi, S. et al., *Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications*. *Curr Pharm Des.* 2003. 11(28):3597-611; e Deshayes, S. et al., *Cell-penetrating peptides: tools*

for intracellular delivery of therapeutics. Cell Mol Life Sci. 2005. 62(16):1839-49) Composti e/o composizioni della presente invenzione possono anche essere formulati per includere agenti penetranti nelle cellule, ad esempio, liposomi, che accrescono la veicolazione delle composizioni negli spazi intracellulari. Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere complessati con peptidi e/o proteine quali, ma non limitati a, peptidi e/o proteine da Aileron Therapeutics (Cambridge, MA) e Permeon Biologics (Cambridge, MA) al fine di permettere la veicolazione intracellulare (Cronican, J.J. et al., Potent delivery of functional proteins into mammalian cells in vitro and in vivo using a supercharged protein. ACS Chem Biol. 2010. 5:747-52; McNaughton, B.R. et al., Mammalian cell penetration, siRNA transfection, and DNA transfection by supercharged proteins. Proc Natl Acad Sci, USA. 2009. 106:6111-6; Verdine, G.L. et al., Stapled peptides for intracellular drug targets. Methods Enzymol. 2012. 503:3-33).

In alcune forme di realizzazione, i polipeptidi penetranti nelle cellule possono comprendere un primo e un secondo dominio. I primi domini possono comprendere polipeptidi super-carichi. I secondi domini possono comprendere un partner di legame-proteina. Come usato nella presente, partner di legame-proteina possono includere, ma non sono limitati a, anticorpi e frammenti funzionali degli stessi, proteine e/o peptidi scaffold. I polipeptidi penetranti nelle cellule possono inoltre comprendere partner di legame intracellulari per i partner di legame-proteina. In alcune forme di realizzazione, i polipeptidi penetranti nelle cellule possono essere capaci di essere secreti da cellule in cui possono essere introdotti composti e/o composizioni della presente invenzione.

Composizioni della presente invenzione comprendenti peptidi e/o proteine possono essere usati per aumentare la trasfezione delle cellule e/o modificare la biodistribuzione di composto/composizione (ad es., prendendo di mira specifici tessuti o tipi cellulari).

#### *Veicoli di formulazione: cellule*

Formulazioni basate su cellule di composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usate per garantire la trasfezione delle cellule (ad es., in carriers cellulari) o modificare la biodistribuzione (ad es., direzionando i carriers cellulari a specifici tessuti o tipi cellulari.)

#### *Metodi di trasferimento cellulare*

Una varietà di metodi è nota nella tecnica e adatta per l'introduzione di acidi nucleici o proteine nelle cellule, inclusi metodi mediati da virus e non mediati da virus. Esempi di tipici metodi non mediati da virus includono, ma non vi si limitano, elettroporazione, trasferimento mediato da fosfato di calcio, nucleofezione, sonoporazione, shock termico, magnetofezione, trasferimento mediato da liposomi, microiniezione, trasferimento mediato da microproiettili (nanoparticelle), trasferimento mediato da polimeri cationici (DEAE-destrano, polietilenimina, polietilenglicole (PEG) e simili) o fusione cellulare.

Il metodo della sonoporazione, o della sonicazione cellulare, è l'uso del suono (ad es., frequenze ultrasoniche) per modificare la permeabilità delle membrane plasmatiche cellulari. Metodi di sonoporazione sono noti agli esperti della tecnica e vengono usati per veicolare gli acidi nucleici *in vivo* (Yoon, C.S. et al., Ultrasound-mediated gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010 7:321-30; Postema, M. et al., Ultrasound-directed drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007 8:355-61; Newman, C.M. et al., Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther.* 2007. 14(6):465-75). Metodi di sonoporazione sono noti nella tecnica e sono anche insegnati ad esempio quando riguardano i batteri nella pubblicazione della domanda di brevetto degli Stati Uniti US2010/0196983 e quando riguardano altri tipi cellulari, ad esempio, nella pubblicazione della domanda di brevetto degli Stati Uniti US2010/0009424.

Metodi di elettroporazione sono anche ben noti nella tecnica e vengono usati per veicolare gli acidi nucleici *in vivo* e a livello clinico (Andre, F.M. et al., Nucleic acids electrotransfer in vivo: mechanisms and practical aspects. *Curr Gene Ther.* 2010 10:267-80; Chiarella, P. et al., Application of electroporation in DNA vaccination protocols. *Curr Gene Ther.* 2010. 10:281-6; Hojman, P., Basic principles and clinical advancements of muscle electrotransfer. *Curr Gene Ther.* 2010 10:128-38). In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente descrizione possono essere veicolati tramite elettroporazione.

#### *Somministrazione e veicolazione*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati tramite qualunque dei metodi o delle vie standard noti nella tecnica. Tali metodi possono includere qualunque via che porta a un esito terapeuticamente efficace. Queste includono, ma non sono limitate a enterica, gastroenterica, epidurale, orale,

transdermica, epidurale (peridurale), intracerebrale (nel cervello), intracerebroventricolare (nei ventricoli cerebrali), epicutanea (applicazione sulla pelle), intradermica, (nella pelle stessa), sottocutanea (sotto la pelle), somministrazione nasale (attraverso il naso), endovenosa (in una vena), intraarteriosa (in un'arteria), intramuscolare (in un muscolo), intracardiaca (nel cuore), infusione intraossea (nel midollo osseo), intratecale (nel canale spinale), intraperitoneale, (infusione o iniezione nel peritoneo), infusione intravescicale, intravitreale, (attraverso l'occhio), iniezione intracavernosa, (alla base del pene), somministrazione intravaginale, somministrazione intrauterina extra-amniotica, transdermica (diffusione attraverso la pelle intatta per distribuzione sistemica), transmucosale (diffusione attraverso una membrana mucosa), insufflazione (sniffatura), sublinguale, sublabiale, enema, gocce per gli occhi (sulla congiuntiva), o in gocce otiche. In forme di realizzazione specifiche, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati in modalità che permettono loro di attraversare la barriera emato-encefalica, barriere vascolari, o altre barriere epiteliali. Metodi di formulazione e somministrazione possono includere qualunque di quelli descritti nella pubblicazione degli Stati Uniti No. 2013/0122007, nel Brevetto US No. 8,415,459 o nella Pubblicazione Internazionale No. WO 2011/151432. Vie di somministrazione non limitanti per composti e/o composizioni della presente invenzione sono descritte qui sotto.

*Somministrazione parenterale e iniettabile*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati per via parenterale. Forme di dosaggio liquide per somministrazione orale e parenterale includono, ma non vi si limitano, emulsioni, microemulsioni, soluzioni, sospensioni, sciroppi, e/o elisir farmaceuticamente accettabili. Oltre agli ingredienti attivi, forme di dosaggio liquide possono comprendere diluenti inerti comunemente usati nella tecnica quali, ad esempio, acqua o altri solventi, agenti solubilizzanti ed emulsionanti quali alcol etilico, alcol isopropilico, etile carbonato, etile acetato, alcol benzilico, benzile benzoato, propilene glicole, 1,3-butilene glicole, dimetilformammide, oli (in particolare, oli di semi di cotone, arachide, mais, germe di grano, oliva, ricino, e sesamo), glicerolo, alcol tetraidrofurfurilico, polietilene glicoli ed esteri con acidi grassi del sorbitano, e miscele degli stessi. Oltre ai diluenti inerti, le composizioni orali possono includere adiuvanti quali

agenti bagnanti, agenti emulsionanti e sospendenti, agenti dolcificanti, aromatizzanti, e/o profumanti. In certe forme di realizzazione per somministrazione parenterale, le composizioni sono miscelate con agenti solubilizzanti quali CREMOPHOR®, alcoli, oli, oli modificati, glicoli, polisorbati, ciclodestrine, polimeri, e/o combinazioni degli stessi. In altre forme di realizzazione, sono inclusi tensioattivi quale l'idrossipropilcellulosa.

Preparazioni iniettabili, ad esempio, sospensioni acquose o oleose iniettabili sterili possono essere formulate secondo la tecnica nota utilizzando agenti disperdenti, agenti bagnanti, e/o agenti sospendenti adatti. Preparazioni iniettabili sterili possono essere soluzioni, sospensioni, e/o emulsioni iniettabili sterili in diluenti e/o solventi parenteralmente accettabili non tossici, ad esempio, come una soluzione in 1,3-butanodiolio. Tra i veicoli e i solventi accettabili che possono essere impiegati ci sono l'acqua, soluzione di Ringer, U.S.P., e soluzione isotonica di sodio cloruro. Oli non volatili sterili sono convenzionalmente impiegati come un mezzo solvente o sospendente. A tale scopo può essere impiegato qualunque semplice olio non volatile includente mono- o digliceridi sintetici. Acidi grassi quale l'acido oleico possono essere usati nella preparazione di preparati iniettabili.

Le formulazioni iniettabili possono essere sterilizzate, ad esempio, tramite filtrazione attraverso un filtro di ritenzione batterica, e/o tramite incorporazione di agenti sterilizzanti nella forma di composizioni solide sterili che possono essere disciolte o disperse in acqua sterile o in un altro mezzo iniettabile sterile prima dell'uso.

Allo scopo di prolungare l'effetto degli ingredienti attivi, è spesso desiderabile rallentare l'assorbimento degli ingredienti attivi dai preparati iniettabili sottocutanei o intramuscolari. Ciò può essere realizzato tramite l'uso di sospensioni liquide di materiale cristallino o amorfo con scarsa solubilità in acqua. Il tasso di assorbimento degli ingredienti attivi dipende dal tasso di dissoluzione che, a sua volta, può dipendere dalla dimensione del cristallo e dalla forma cristallina. In alternativa, un assorbimento ritardato di una forma di farmaco somministrata per via parenterale viene realizzato dissolvendo o sospendendo il farmaco in un veicolo oleoso. Forme a deposito iniettabili vengono prodotte formando matrici per microincapsulazione del farmaco in polimeri biodegradabili quale polilattide-poliglicolide. A seconda del rapporto di farmaco a polimero e della natura del particolare polimero impiegato, può essere controllato il tasso di rilascio di farmaco. Esempi di altri polimeri biodegradabili includono poli(ortoesteri) e poli(anidridi). Le formulazioni iniettabili a deposito vengono preparate intrappolando il farmaco

in liposomi o in microemulsioni che sono compatibili con i tessuti corporei.

#### *Somministrazione rettale e vaginale*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati per via rettale e/o per via vaginale. Le composizioni per somministrazione rettale o vaginale sono tipicamente supposte che possono essere preparate miscelando le composizioni con eccipienti non irritanti adatti quali burro di cacao, polietilenglicole o una cera per supposte che sono solidi a temperatura ambiente ma liquidi a temperatura corporea e quindi si sciolgono nel retto o nella cavità vaginale e rilasciano l'ingrediente attivo.

#### *Somministrazione orale*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati per via orale. Forme di dosaggio solide per somministrazione orale includono capsule, compresse, pillole, polveri, e granuli. In tali forme di dosaggio solide, un ingrediente attivo viene miscelato con almeno un eccipiente inerte farmaceuticamente accettabile quale sodio citrato o dicalcio fosfato e/o riempitivi o sostanze inerti (ad es. amidi, lattosio, saccarosio, glucosio, mannitolo, e acido silicico), leganti (ad es. carbossimetilcellulosa, alginati, gelatina, polivinilpirrolidone, saccarosio, e acacia), umettanti (*ad es.* glicerolo), agenti disgreganti (*ad es.* agar, calcio carbonato, amido di patata o tapioca, acido alginico, certi silicati, e sodio carbonato), agenti ritardanti la soluzione (ad es. paraffina), acceleratori di assorbimento (*ad esempio* composti di ammonio quaternario), agenti bagnanti (ad es. alcol cetilico e glicerolo monostearato), assorbenti (ad es. caolino e argilla bentonite), e lubrificanti (ad es. talco, calcio stearato, magnesio stearato, polietilene glicoli solidi, sodio lauril solfato), e miscele degli stessi. Nel caso di capsule, compresse e pillole, la forma di dosaggio può comprendere agenti tamponanti.

#### *Somministrazione topica o transdermica*

Come descritto nella presente, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere formulati per somministrazione per via topica. La pelle può essere un sito bersaglio ideale per la veicolazione poichè essa è facilmente accessibile. Tre vie sono comunemente considerate per veicolare composti e/o composizioni della presente invenzione alla pelle: (i) applicazione topica (ad es. per trattamento locale/regionale e/o applicazioni

cosmetiche); (ii) iniezione intradermica (ad es. per trattamento locale/regionale e/o applicazioni cosmetiche); e (iii) veicolazione sistemica (ad es. per trattamento di malattie dermatologiche che colpiscono regioni sia cutanee sia extracutanee). Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere veicolati alla pelle tramite diversi differenti approcci noti nella tecnica.

In alcune forme di realizzazione, l'invenzione fornisce una varietà di medicazioni (ad es., medicazioni per ferite) o bendaggi (ad es., bendaggi adesivi) per realizzare opportunamente e/o efficacemente i metodi della presente descrizione. Tipicamente la medicazione o i bendaggi possono comprendere quantità sufficienti di composti e/o composizioni della presente invenzione descritti nella presente per permettere agli utilizzatori di compiere trattamenti multipli.

Forme di dosaggio per somministrazione topica e/o transdermica possono includere unguenti, paste, creme, lozioni, gel, polveri, soluzioni, spray, preparati per inalazione e/o cerotti. In generale, gli ingredienti attivi vengono mescolati in condizioni sterili con eccipienti farmaceuticamente accettabili e/o qualunque preservante e/o tampone necessitato. Inoltre, la presente invenzione contempla l'uso di cerotti transdermici, che spesso hanno il vantaggio aggiunto di fornire al corpo rilascio controllato di composti e/o composizioni della presente invenzione. Tali forme di dosaggio possono essere preparate, ad esempio, dissolvendo e/o dispensando composti e/o composizioni nel mezzo appropriato. In alternativa o in aggiunta, i tassi possono essere controllati fornendo membrane di controllo del tasso e/o disperdendo i composti e/o le composizioni in una matrice polimerica e/o in un gel.

Formulazioni adatte per somministrazione topica includono, ma non vi si limitano, preparazioni liquide e/o semi liquide quali linimenti, lozioni, emulsioni di olio in acqua e/o acqua in olio quali creme, unguenti e/o paste, e/o soluzioni e/o sospensioni.

Formulazioni somministrabili per via topica possono, ad esempio, comprendere da circa 1% a circa 10% (p/p) di ingrediente attivo, sebbene la concentrazione di ingrediente attivo possa essere alta quanto il limite di solubilità dell'ingrediente attivo nel solvente. Formulazioni per somministrazione topica possono inoltre comprendere uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nella presente.

*Somministrazione a deposito*

Come descritto nella presente, in alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono formulati in depositi per rilascio esteso. In generale, organi o tessuti specifici ("tessuti bersaglio") vengono mirati per la somministrazione.

In alcuni aspetti dell'invenzione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono spazialmente trattenuti all'interno di o vicino a tessuti bersaglio. Sono forniti metodi per fornire composti e/o composizioni a tessuti bersaglio di soggetti mammiferi mettendo a contatto i tessuti bersaglio (che comprendono una o più cellule bersaglio) con composti e/o composizioni in condizioni tali che siano sostanzialmente trattenuti nei tessuti bersaglio, intendendo che almeno 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99 o più del 99.99% della composizione viene trattenuto nei tessuti bersaglio. Vantaggiosamente, la ritenzione viene determinata misurando la quantità di composti e/o composizioni che entrano in una o più cellule bersaglio. Ad esempio, almeno 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% o più di 99.99% di composti e/o composizioni somministrati ai soggetti sono presenti a livello intracellulare in un periodo di tempo dopo la somministrazione. Ad esempio, può essere compiuta un'iniezione intramuscolare a soggetti mammiferi utilizzando composizioni acquose comprendenti composti e/o composizioni della presente invenzione e uno o più reagenti di trasfezione, e viene determinata la ritenzione misurando la quantità di composti e/o composizioni presente nelle cellule muscolari.

Certi aspetti della descrizione sono diretti a metodi per fornire composti e/o composizioni della presente invenzione a tessuti bersaglio di soggetti mammiferi, mettendo a contatto i tessuti bersaglio (comprendenti una o più cellule bersaglio) con composti e/o composizioni in condizioni tali che sono sostanzialmente trattenuti in tali tessuti bersaglio. Composti e/o composizioni comprendono abbastanza ingrediente attivo in modo tale che l'effetto di interesse venga prodotto in almeno una cellula bersaglio. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni comprendono in generale uno o più agenti penetranti nelle cellule, sebbene siano contemplate anche formulazioni "nude" (quali senza agenti penetranti nelle cellule o altri agenti), con o senza carriers farmaceuticamente accettabili.

In alcune forme di realizzazione, la quantità di un fattore di crescita presente nelle cellule in un tessuto viene

desiderabilmente aumentata. Preferibilmente, questo aumento in fattore di crescita è limitato a livello spaziale alle cellule all'interno del tessuto bersaglio. Pertanto, sono descritti metodi per aumentare la quantità di fattore di crescita di interesse nei tessuti di soggetti mammiferi. In alcune forme di realizzazione, sono fornite formulazioni comprendenti composti e/o composizioni caratterizzati dal fatto che è stato determinato che la quantità unitaria fornita produce un desiderato livello di fattore di crescita di interesse in una sostanziale percentuale di cellule contenute all'interno di predeterminati volumi di tessuto bersaglio.

In alcune forme di realizzazione, le formulazioni comprendono una pluralità di differenti composti e/o composizioni, dove uno o più di uno prendono di mira biomolecole di interesse. Facoltativamente, le formulazioni possono anche comprendere agenti penetranti nelle cellule per facilitare la veicolazione intracellulare di composti e/o composizioni. In tali forme di realizzazione, vengono fatte determinazioni di dose di composto e/o composizione richiesta per prendere di mira biomolecole di interesse in sostanziali percentuali di cellule contenute all'interno di volumi predeterminati del tessuto bersaglio (generalmente, senza prendere di mira biomolecole di interesse in tessuti adiacenti o distali). Le dosi determinate vengono poi introdotte direttamente nei tessuti in oggetto. In alcune forme di realizzazione, l'invenzione fornisce composti e/o composizioni da veicolare in più di una somministrazione o tramite somministrazione di dosi suddivise.

#### *Somministrazione polmonare*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere preparate, confezionate, e/o vendute in formulazioni adatte per somministrazione polmonare. In alcune forme di realizzazione, tale somministrazione è attraverso la cavità buccale. In alcune forme di realizzazione, le formulazioni possono comprendere particelle secche comprendenti ingredienti attivi. In tali forme di realizzazione, particelle secche possono avere un diametro nel range da circa 0.5 nm a circa 7 nm o da circa 1 nm a circa 6 nm. In alcune forme di realizzazione, le formulazioni possono essere nella forma di polveri secche per somministrazione utilizzando dispositivi comprendenti serbatoi di polvere secca in cui possono essere diretti getti di propellente per disperdere tale polvere. In alcune forme di realizzazione, possono essere usati contenitori erogatori autopropellenti solvente/polvere. In tali forme di realizzazione, gli ingredienti attivi possono essere

disciolti e/o sospesi in un propellente a basso punto di ebollizione in contenitori sigillati. Tali polveri possono comprendere particelle in cui almeno il 98% delle particelle in peso hanno diametri maggiori di 0.5 nm ed almeno il 95% delle particelle in numero hanno diametri minori di 7 nm. In alternativa, almeno il 95% delle particelle in peso hanno un diametro maggiore di 1 nm e almeno il 90% delle particelle in numero hanno un diametro minore di 6 nm. Composizioni di polvere secca possono includere un diluente solido di polvere fine quale zucchero e sono opportunamente fornite in una forma di dose unitaria.

I propellenti a basso punto di ebollizione generalmente includono propellenti liquidi aventi un punto di ebollizione al di sotto di 65°F a pressione atmosferica. Generalmente i propellenti possono costituire da 50% a 99.9% (p/p) della composizione, e l'ingrediente attivo può costituire da 0.1% a 20% (p/p) della composizione. I propellenti possono inoltre comprendere ingredienti aggiuntivi quale tensioattivo non ionico liquido e/o anionico solido e/o diluente solido (che possono avere dimensioni delle particelle dello stesso ordine delle particelle comprendenti gli ingredienti attivi).

Composizioni farmaceutiche formulate per veicolazione polmonare possono fornire ingredienti attivi nella forma di goccioline di soluzione e/o sospensione. Tali formulazioni possono essere preparate, confezionate, e/o vendute come soluzioni e/o sospensioni acquose e/o alcoliche diluite, facoltativamente sterili, comprendenti gli ingredienti attivi, e possono opportunamente essere somministrate utilizzando qualunque dispositivo di nebulizzazione e/o atomizzazione. Tali formulazioni possono inoltre comprendere uno o più ingredienti aggiuntivi includenti, ma non limitati a, un agente aromatizzante quale saccarina sodica, un olio volatile, un agente tamponante, un agente tensioattivo, e/o un preservante quale metilidrossibenzoato. Goccioline fornite da questa via di somministrazione possono avere un diametro medio nel range da circa 0.1 nm a circa 200 nm.

#### *Somministrazione intranasale, nasale e buccale*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati per via nasale e/o intranasale. In alcune forme di realizzazione, le formulazioni descritte nella presente come utili per la veicolazione polmonare possono anche essere utili per la veicolazione intranasale. In alcune forme di realizzazione, le formulazioni per somministrazione intranasale comprendono una polvere

grossolana comprendente l'ingrediente attivo e avente una particella media da circa 0.2  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ . Tali formulazioni vengono somministrate in un modo in cui viene fatta una sniffata, cioè tramite rapida inalazione attraverso il passaggio nasale da un contenitore della polvere mantenuto vicino al naso.

Formulazioni adatte per somministrazione nasale possono, ad esempio, comprendere poco quanto 0.1% (p/p) e tanto quanto 100% (p/p) di ingrediente attivo, e possono comprendere uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nella presente. Una composizione farmaceutica può essere preparata, confezionata, e/o venduta in una formulazione adatta per somministrazione buccale. Tali formulazioni possono, ad esempio, essere nella forma di compresse e/o losanghe fatte utilizzando metodi convenzionali, e possono, ad esempio, da 0.1% a 20% (p/p) di ingrediente attivo, l'equilibrio comprendendo una composizione dissolvibile e/o degradabile per via orale e, facoltativamente, uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nella presente. In alternativa, formulazioni adatte per somministrazione buccale possono comprendere polveri e/o soluzioni e/o sospensioni aerosolizzate e/o atomizzate comprendenti gli ingredienti attivi. Tali formulazioni polverizzate, aerosolizzate, e/o aerosolizzate, quando disperse, possono comprendere dimensioni medie delle particelle e/o delle goccioline nel range da circa 0.1 nm a circa 200 nm, e possono inoltre comprendere uno o più di qualunque ingrediente aggiuntivo descritto nella presente.

#### *Somministrazione oftalmica o otica*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere preparati, confezionati, e/o venduti in formulazioni adatte per somministrazione oftalmica e/o otica. Tali formulazioni possono, ad esempio, essere nella forma di gocce per gli occhi e/o per le orecchie includenti, ad esempio, una soluzione e/o una sospensione 0.1/1.0% (p/p) dell'ingrediente attivo in eccipienti liquidi acquosi e/o oleosi. Tali gocce possono inoltre comprendere agenti tamponanti, sali, e/o uno o più altri di qualunque ingrediente aggiuntivo descritto nella presente. Altre formulazioni somministrabili a livello oftalmico che sono utili includono quelle che comprendono ingredienti attivi in forma microcristallina e/o in preparazioni liposomiali. Inserti subretina possono anche essere usati come forme di somministrazione.

#### *Somministrazione di carico utile: agenti rivelabili e agenti terapeutici*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati in un certo numero di differenti scenari in cui si desidera la veicolazione di una sostanza (il "carico utile") a un bersaglio biologico, ad esempio veicolazione di sostanze rivelabili per la rivelazione del bersaglio, o veicolazione di agenti terapeutici e/o diagnostici. Metodi di rivelazione possono includere, ma non sono limitati a, metodi di imaging sia *in vitro* che *in vivo*, *ad es.*, immunostochimica, imaging a bioluminescenza (BLI), Imaging a Risonanza Magnetica (MRI), tomografia a emissione di positroni (PET), microscopia elettronica, tomografia computerizzata a raggi X, Imaging Raman, tomografia di coerenza ottica, imaging di assorbimento, imaging termico, imaging a riflettanza di fluorescenza, microscopia a fluorescenza, imaging tomografico a fluorescenza molecolare, imaging di risonanza magnetica nucleare, imaging a raggi X, imaging a ultrasuoni, imaging fotoacustico, saggi di laboratorio, o in qualunque situazione dove si richiede tagging/colorazione/imaging.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni possono essere progettati per includere sia linker sia carichi utili in qualunque orientamento utile. Ad esempio, linker aventi due estremità possono essere usati per attaccare una estremità al carico utile e l'altra estremità a composti e/o composizioni. Composti e/o composizioni della presente invenzione possono includere più di un carico utile. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni possono comprendere uno o più linker clivabili. In alcune forme di realizzazione, i carichi utili possono essere attaccati a composti e/o composizioni tramite un linker e possono essere marcati fluorescentemente per la tracciatura *in vivo*, *ad esempio* a livello intracellulare.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati nella veicolazione di farmaco reversibile nelle cellule.

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati nel targeting intracellulare di carichi utili, *ad es.*, agenti rivelabili o terapeutici, a organelli specifici. Inoltre, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati per veicolare agenti terapeutici a cellule o a tessuti, *ad esempio*, negli animali viventi. Ad esempio, i composti e/o le composizioni descritti nella presente possono essere usati per veicolare agenti chemioterapici per uccidere le cellule cancerose. Composti e/o composizioni possono essere attaccati a agenti terapeutici attraverso uno o più linker che possono facilitare la permeazione della membrana permettendo

agli agenti terapeutici di muoversi nelle cellule per raggiungere bersagli intracellulari.

In alcune forme di realizzazione, i carichi utili possono essere un agente terapeutico quali citotossine, ioni radioattivi, chemioterapici, o altri agenti terapeutici. Citotossine e/o agenti citotossici possono includere qualunque agente che può essere dannoso per le cellule. Esempi includono, ma non vi si limitano, taxolo, citocalasina B, gramicidina D, bromuro di etidio, emetina, mitomicina, etoposide, teniposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidrossiantracinedione, mitoxantrone, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotestosterone, glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo, puromicina, maitansinoidi, ad es., maitansinolo (si veda il Brevetto U.S. No. 5,208,020), rachelmicina (CC-1065, si veda i Brevetti U.S. No. 5,475,092, 5,585,499, e 5,846,545), e analoghi o omologhi degli stessi. Ioni radioattivi includono, ma non sono limitati a iodio (ad es.,  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$ ),  $^{89}\text{Sr}$ , fosforo, palladio, cesio, iridio, fosfato, cobalto,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ , e praseodimio. Altri agenti terapeutici includono, ma non vi si limitano, antimetaboliti (ad es., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracile decarbazina), agenti alchilanti (ad es., mecloretamina, tiotepa clorambucile, rachelmicina (CC-1065), melfalan, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamide, busulfan, dibromomannitolo, streptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiammina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (ad es., daunorubicina (in precedenza daunomicina) e doxorubicina), antibiotici (ad es., dactinomicina (in precedenza actinomicina), bleomicina, mitramicina, ed antramicina (AMC)), ed agenti anti-mitotici (ad es., vincristina, vinblastina, taxolo e maitansinoidi).

In alcune forme di realizzazione, carichi utili possono essere agenti rivelabili, quali varie piccole molecole organiche, composti inorganici, nanoparticelle, enzimi o substrati enzimatici, materiali fluorescenti, materiali luminescenti (ad es., luminolo), materiali bioluminescenti (ad es., luciferasi, luciferina, ed equorina), materiali chemiluminescenti, materiali radioattivi (ad es.,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{81\text{m}}\text{Kr}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ , o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (ad es., come pertecnetato (tecnecato(VII),  $\text{TcO}_4^-$ )), ed agenti di contrasto (ad es., oro (ad es., nanoparticelle di oro), gadolinio (ad es., Gd chelato), ossidi di ferro (ad es., ossido di ferro superparamagnetico (SPIO), nanoparticelle di ossido di ferro monocristallino (MION), e ossido di ferro superparamagnetico ultrapi piccolo (USPIO)), chelati di manganese (ad es., Mn-DPDP), solfato di bario, mezzi di contrasto iodati (ioexolo),

microbolle, o perfluorocarburi). Tali marcatori otticamente rivelabili includono ad esempio, senza limitazione, acido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbene-2,2'-disolfonico; acridina e derivati (ad es., acridina ed acridina isotiocianato); acido 5-(2'-amminoetil)amminonaftalene-1-solfonico (EDANS); 4-ammino-N-[3-vinilsolfonil]fenil]naftalimmide-3,5 disolfonato; N-(4-anilino-1-naftil)maleimmide; antranilammide; BODIPY; Brilliant Yellow; cumarina e derivati (ad es., cumarina, 7-ammino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), e 7-ammino-4-trifluorometilcumarina (Cumarina 151)); coloranti a base di cianina; cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindolo (DAPI); 5' 5''-dibromopirogallol-solfonaftaleina (Rosso di Bromopirogallolo); 7-dietilammino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; dietilenetriammina pentaacetato; acido 4,4'-diisotiocianatodidro-stilbene-2,2'-disolfonico; acido 4,4'-diisotiocianatostilbene-2,2'-disolfonico; 5-[dimetilammino]-naftalene-1-solfonilcloruro (DNS, dansilcloruro); 4-dimetilamminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina e derivati (ad es., eosina e eosina isotiocianato); eritrosina e derivati (ad es., eritrosina B e eritrosina isotiocianato); etidio; fluoresceina e derivati (ad es., 5-carbossifluoresceina (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)amminofluoresceina (DTAF), 2',7'-dimetossi-4' 5'-dicloro-6-carbossifluoresceina, fluoresceina, fluoresceina isotiocianato, X-rodamina-5-(e-6)-isotiocianato (QFITC o XRITC), e fluorescamina); 2-[2-[3-[[1,3-diidro-1,1-dimetil-3-(3-solfopropil)-2H-benz[e]indol-2-ilidene]etilidene]-2-[4-(etossicarbonil)-1-piperazinil]-1-ciclopenten-1-il]etenil]-1,1-dimetil-3-(3-solfopropil)-1H-benz[e]indolium idrossido, sale interno, composto con n,n-dietiletanamina(1:1) (IR144); 5-cloro-2-[2-[3-[(5-cloro-3-etil-2(3H)-benzotiazol-ilidene)etilidene]-2-(difenilammino)-1-ciclopenten-1-il]etenil]-3-etile benzotiazolio perclorato (IR140); Malachite Verde isotiocianato; 4-metilumbelliferone ortocresoltaleina; nitrotirosina; pararosanilina; Rosso Fenolo; B-ficoeritrina; o-ftaldialdeide; pirene e derivati (ad es., pirene, pirene butirrato, e succinimidil 1-pirene); punti quantici butirrato; Reactive Red 4 (CIBACRON™ Brilliant Red 3B-A); rodamina e derivati (ad es., 6-carbossi-X-rodamina (ROX), 6-carbossirodamina (R6G), lissamina rodamina B solfonilcloruro rodarnina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina X isotiocianato, solforodamina B, solforodamina 101, solfonilcloruro derivato di solforodamina 101 (Texas Red), N,N,N',N'tetrametil-6-carbossirodamina (TAMRA) tetrametil rodamina, e tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC)); riboflavina; acido rosolico; terbio chelato derivati; Cianina-3 (Cy3); Cianina-5 (Cy5);

cianina-5.5 (Cy5.5), Cianina-7 (Cy7); IRD 700; IRD 800; Alexa 647; La Jolta Blue; ftalo cianina; e naftalo cianina. In alcune forme di realizzazione, l'agente rivelabile può essere un precursore non rivelabile che diventa rivelabile su attivazione (ad es., costrutti fluoroforo-tetrazina fluorogeni (ad es., tetrazina-BODIPY FL, tetrazina-Oregon Green 488, o tetrazina-BODIPY TMR-X) o agenti fluorogeni attivabili da enzima (ad es., PROSENSE® (VisEn Medical))). Saggi in vitro in cui possono essere usate le composizioni marcate con enzima includono, ma non vi si limitano, saggi di immunoassorbente legato ad enzima (ELISA), saggi di immunoprecipitazione, immunofluorescenza, immunosaggi enzimatici (EIA), radioimmunosaggi (RIA), ed analisi western blot.

#### *Combinazioni*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere usati in combinazione con uno o più altri agenti terapeutici, profilattici, diagnostici, o di imaging. "In combinazione con", non si intende che implica che gli agenti debbano essere somministrati nello stesso tempo e/o formulati per la veicolazione insieme, sebbene questi metodi di veicolazione siano nell'ambito della presente descrizione. Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati simultaneamente con, prima di, o successivamente a, uno o più altri prodotti terapeutici desiderati o procedure mediche. In generale, ogni agente sarà somministrato in una dose e/o su una schedula temporale determinata per quell'agente. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione comprende la veicolazione di composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche, o di imaging in combinazione con agenti che possono migliorare la loro biodisponibilità, ridurre e/o modificare il loro metabolismo, inibire la loro escrezione, e/o modificare la loro distribuzione all'interno del corpo. In alcuni casi, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere combinati con uno o più agenti terapeutici noti nella tecnica. Tali agenti possono includere BYM338 (Novartis, Basel, Switzerland,) in cui la somministrazione può comprendere qualunque dei metodi descritti nella sperimentazione clinica numero NCT01925209 dal titolo *Efficacy and Safety of Bimagrumab/BYM338 at 52 Weeks on Physical Function, Muscle Strength, Mobility in sIBM Patients (RESILIENT)*. Altri agenti che possono essere usati in combinazione con composti e/o composizioni della presente invenzione possono includere qualunque di quelli descritti nella Pubblicazione degli Stati Uniti No. 2013/0122007, nel Brevetto degli Stati Uniti No. 8,415,459 o nella

Pubblicazione Internazionale No. WO 2011/151432.

*Dosaggio e Forme di dosaggio*

La presente descrizione comprende la veicolazione di composti e/o composizioni della presente invenzione per qualunque di terapeutica, farmaceutica, diagnostica o imaging tramite qualunque via appropriata tenendo in considerazione probabili progressi nelle scienze della veicolazione dei farmaci. La veicolazione può essere nuda o formulata.

*Veicolazione nuda*

Composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere veicolati a cellule, tessuti, organi e/o organismi in forma nuda. Come usato nella presente, il termine "nudo" si riferisce a composti e/o composizioni veicolati privi di agenti o modificazioni che promuovono la trasfezione o la permeabilità. I composti e/o le composizioni nudi possono essere veicolati alle cellule, ai tessuti, agli organi e/o agli organismi utilizzando vie di somministrazione note nella tecnica e descritte nella presente. In alcune forme di realizzazione, la veicolazione nuda può includere la formulazione in un tampone semplice quale soluzione salina o PBS.

*Veicolazione Formulata*

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere formulati, utilizzando metodi descritti nella presente. Le formulazioni possono comprendere composti e/o composizioni che possono essere modificati e/o non modificati. Le formulazioni possono inoltre includere, ma non vi si limitano, agenti penetranti nelle cellule, carriers farmaceuticamente accettabili, agenti di veicolazione, polimeri bioerodibili o biocompatibili, solventi, e/o depositi di veicolazione a rilascio sostenuto. Formulazioni della presente invenzione possono essere veicolate alle cellule utilizzando vie di somministrazione note nella tecnica e descritte nella presente.

Le composizioni possono anche essere formulate per veicolazione diretta a organi o tessuti in qualunque di diverse modalità nella tecnica includenti, ma non limitate a, immersione o bagnatura diretta, attraverso un catetere, tramite gel, polvere, unguenti, creme, gel, lozioni, e/o gocce, tramite uso di substrati quali tessuto o materiali biodegradabili rivestiti o impregnati con composizioni, e simili.

*Dosaggio*

La presente descrizione fornisce metodi comprendenti somministrare uno o più composti e/o composizioni a soggetti che ne necessitano. Composti e/o composizioni della presente invenzione, o composizioni profilattiche degli stessi, possono essere somministrati ai soggetti utilizzando qualunque quantità e qualunque via di somministrazione efficace per prevenire, trattare, diagnosticare, o fare l'imaging di malattie, disordini e/o condizioni. L'esatta quantità necessaria varierà da soggetto a soggetto, secondo la specie, l'età e/o la condizione generale del soggetto, la severità di malattia, la particolare composizione, la modalità di somministrazione, la modalità di attività, e simili. Composizioni in accordo con l'invenzione sono tipicamente formulate in forma unitaria di dosaggio per facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio. Si comprenderà, tuttavia, che l'uso giornaliero totale di composizioni della presente invenzione sarà deciso dal medico curante nell'ambito di un valido giudizio medico. Lo specifico livello di dose terapeuticamente efficace, profilatticamente efficace, o appropriato per l'imaging per qualunque particolare paziente dipenderà da una varietà di fattori includenti il disordine che viene trattato e la severità del disordine; l'attività dello specifico composto impiegato; la specifica composizione impiegata; l'età, il peso corporeo, la salute generale, il sesso e la dieta del paziente; il tempo di somministrazione, la via di somministrazione, e il tasso di escrezione dello specifico composto impiegato; la durata del trattamento; farmaci usati in combinazione o in coincidenza con lo specifico composto impiegato; e simili fattori ben noti nelle tecniche mediche.

In certe forme di realizzazione, composizioni in accordo con la presente invenzione possono essere somministrate a livelli di dosaggio sufficienti per veicolare da circa 0.0001 mg/kg a circa 100 mg/kg, da circa 0.01 mg/kg a circa 50 mg/kg, da circa 0.1 mg/kg a circa 40 mg/kg, da circa 0.5 mg/kg a circa 30 mg/kg, da circa 0.01 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 0.1 mg/kg a circa 10 mg/kg, o da circa 1 mg/kg a circa 25 mg/kg, di peso corporeo del soggetto per giorno, una o più volte al giorno, per ottenere il desiderato effetto terapeutico, diagnostico, profilattico, o di imaging. Il dosaggio desiderato può essere veicolato tre volte al giorno, due volte al giorno, una volta al giorno, a giorni alterni, ogni tre giorni, ogni settimana, ogni due settimane, ogni tre settimane, o ogni quattro settimane. In certe forme di realizzazione, il dosaggio desiderato può essere veicolato utilizzando molteplici somministrazioni

(ad es., due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, quattordici, o più somministrazioni).

Secondo la presente invenzione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati in regimi a dose suddivisa. Come usato nella presente, una "dose suddivisa" è la suddivisione di una singola dose unitaria o dose giornaliera totale in due o più dosi, ad es., due o più somministrazioni della singola dose unitaria. Come usato nella presente, una "singola dose unitaria" è una dose di qualunque terapeutico somministrata in una dose/in una volta/una singola via/un singolo punto di contatto, cioè, singolo evento di somministrazione. Come usato nella presente, una "dose giornaliera totale" è una quantità data o prescritta in un periodo di 24 ore. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati come una singola dose unitaria. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere somministrati ai soggetti in dosi suddivise. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere formulati in solo tampone o in formulazioni descritte nella presente. Composizioni farmaceutiche descritte nella presente possono essere formulate in forme di dosaggio descritte nella presente, quale una topica, intranasale, intratracheale, o iniettabile (ad es., endovenosa, intraoculare, intravitreale, intramuscolare, intracardiaca, intraperitoneale, sottocutanea). Considerazioni generali nella formulazione e/o nella produzione di agenti farmaceutici si possono trovare, ad esempio, in Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (incorporato nella presente per riferimento).

#### *Rivestimenti o Gusci*

Forme di dosaggio solide di compresse, confetti, capsule, pillole, e granuli possono essere preparate con rivestimenti e gusci quali rivestimenti enterici e altri rivestimenti ben noti nella tecnica di formulazione farmaceutica. Possono facoltativamente comprendere agenti opacizzanti e possono essere di una composizione che rilasciano l'ingrediente attivo/gli ingredienti attivi solamente, o preferenzialmente, in una determinata parte del tratto intestinale, facoltativamente, in una modalità ritardata. Esempi di composizioni incorporanti che possono essere usate includono sostanze polimeriche e cere. Composizioni solide di un tipo analogo possono essere

impiegate come riempitivi in capsule di gelatina piene rigide e morbide utilizzando tali eccipienti come lattosio e/o zucchero del latte come pure polietilene glicoli ad alto peso molecolare e simili.

#### *Saggi*

In alcuni casi, le proteine ricombinanti (inclusenti, ma non limitate alle proteine chimeriche) descritte nella presente e/o anticorpi diretti verso tali proteine possono essere sviluppati utilizzando saggi descritti nella presente.

In alcuni casi, le proteine ricombinanti (inclusenti, ma non limitate alle proteine chimeriche) descritte nella presente e/o gli anticorpi diretti verso tali proteine possono essere usati in saggi per sviluppare altre proteine ricombinanti e/o anticorpi della presente descrizione.

#### *Saggi di legame*

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce saggi di legame. Come usato nella presente, il termine "saggio di legame" si riferisce a un saggio usato per valutare la capacità di due o più fattori di associarsi. Tali saggi possono valutare la capacità di un desiderato antigene di legare un desiderato anticorpo e quindi usare uno o più metodi di rivelazione per rivelare il legame. Saggi di legame dell'invenzione possono includere, ma non sono limitati a saggi basati su risonanza plasmonica di superficie, ELISA e saggi basati su FACS. Saggi di legame dell'invenzione possono comprendere l'uso di una o più proteine ricombinanti descritte nella presente, includenti, ma non limitate a qualunque proteina membro della famiglia del TGF- $\beta$ , qualunque proteina chimerica, qualunque cofattore e qualunque modulo, combinazione o frammento degli stessi.

#### *Saggi basati su cellule*

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce saggi basati su cellule. Come usato nella presente, il termine "saggio basato su cellule" si riferisce a un saggio comprendente almeno un aspetto che implica l'uso di una cellula vivente o una coltura cellulare. In alcune forme di realizzazione, questi possono essere utili per valutare la modulazione del rilascio del fattore di crescita dai GPC, riferiti nella presente come "saggi di rilascio del fattore di crescita". In alcune forme di realizzazione, saggi basati su cellule possono essere utili per valutare la modulazione dell'attività del fattore di crescita, riferiti nella presente come "saggi di attività del fattore di crescita". Saggi basati su cellule della presente invenzione possono comprendere cellule di espressione e/o cellule

rispondenti. Le cellule di espressione, come riferite nella presente, sono cellule che esprimono uno o più fattori che vengono analizzati in un particolare saggio. Tale espressione può essere naturale o può essere il risultato di trasfezione e/o trasduzione di un gene estraneo. In alcune forme di realizzazione, l'espressione di uno o più fattori tramite cellule di espressione può essere accresciuta o soppressa tramite l'aggiunta di uno o più fattori esogeni. In alcune forme di realizzazione, le cellule di espressione possono comprendere linee cellulari (ad es. cellule HEK293, cellule CHO, cellule TMLC, cellule 293T/17, cellule Hs68, cellule CCD1112sk, cellule HFF-1, Fibroblasti cheloidi o cellule Sw-480.) In alcune forme di realizzazione, linee cellulari comprendenti cellule di espressione possono esprimere una o più proteine ricombinanti della presente descrizione (ad es. naturalmente e/o attraverso trasfezione, trasfezione stabile, e/o trasduzione).

In alcune forme di realizzazione, saggi di rilascio/attività del fattore di crescita possono comprendere cellule di espressione che esprimono i GPC. In tali forme di realizzazione, fattori aggiuntivi possono essere co-espressi nelle e/o combinati con le cellule di espressione per determinare il loro effetto sul rilascio del fattore di crescita da tali GPC. In alcune forme di realizzazione, integrine (includenti, ma non limitate a integrina  $\alpha_v\beta_6$ , integrina  $\alpha_v\beta_8$  e/o integrina  $\alpha_9\beta_1$ ) vengono co-esprese e/o altrimenti introdotte in cellule di espressione esprimenti GPC. In alcune forme di realizzazione, tale espressione di integrina aggiuntiva può facilitare il rilascio del fattore di crescita. In alcune forme di realizzazione, le LTBP, le fibrilline e/o le GARP e/o varianti delle stesse vengono co-esprese e/o altrimenti introdotte in cellule di espressione.

In alcune forme di realizzazione, uno o più geni possono essere deleti, silenziati e/o altrimenti modulati nelle cellule di espressione a seconda del focus di un particolare saggio. In alcune forme di realizzazione, uno o più prodotti genici possono essere modulati a livello di RNA e/o di proteina. In alcune forme di realizzazione, i prodotti genici possono essere ridotti attraverso l'introduzione di molecole di siRNA nelle cellule di espressione. In alcune forme di realizzazione, i prodotti genici da geni di LTBP, fibrillina e/o GARP possono essere ridotti e/o eliminati dalle cellule di espressione della presente invenzione.

Saggi basati su cellule della presente invenzione, includenti, ma non limitati a saggi di rilascio/attività del fattore di crescita, possono comprendere cellule rispondenti. Come usato nella presente, il termine "cellula rispondente"

si riferisce a una cellula che va incontro a una risposta a uno o più fattori introdotti in un saggio. In alcune forme di realizzazione, tali risposte possono includere una variazione nell'espressione genica, in cui tali cellule modulano la trascrizione di uno o più geni al contatto con uno o più fattori introdotti. In alcune forme di realizzazione, le cellule rispondenti possono andare incontro a una variazione nel fenotipo, nel comportamento e/o nella vitalità. In alcune forme di realizzazione, le cellule rispondenti comprendono uno o più geni reporter. Come usato nella presente, il termine "gene reporter" si riferisce a un gene sintetico comprendente tipicamente un promotore e una regione codificante per proteina codificante per uno o più prodotti genici rivelabili. I geni reporter sono tipicamente progettati in modo tale che la loro espressione possa essere modulata in risposta a uno o più fattori che vengono analizzati tramite un particolare saggio. Ciò può essere effettuato manipolando il promotore dei geni reporter. Come usato nella presente, il termine promotore si riferisce a parte di un gene che inizia la trascrizione di quel gene. I promotori tipicamente comprendono nucleotidi all'estremità al 3' del filamento antisense di un dato gene e non sono trascritti durante l'espressione genica. I promotori tipicamente funzionano attraverso l'interazione con uno o più fattori di trascrizione come pure con enzimi RNA polimerasi per dare inizio alla trascrizione della porzione del gene codificante per la proteina. Segmenti del promotore che interagiscono fisicamente con uno o più fattori di trascrizione e/o enzimi polimerasi sono riferiti nella presente come elementi di risposta. In alcune forme di realizzazione, i geni reporter sono progettati per comprendere promotori e/o elementi di risposta che è noto che sono rispondenti a uno o più fattori (inclusi, ma non limitati i fattori di crescita) che vengono analizzati in un dato saggio. Variazioni nell'espressione genica di cellule rispondenti possono essere misurate secondo qualunque metodo disponibile nella tecnica per dare dati di espressione genica. Tali dati di espressione genica possono essere ottenuti nella forma di dati di attività della luciferasi [spesso misurata in termini di unità di luce relativa (RLU).] In alcuni casi, le cellule rispondenti vanno incontro a variazione nella vitalità in risposta a uno o più fattori introdotti in un saggio. Tali cellule rispondenti possono essere usate in saggi di proliferazione come descritti nella presente. Variazioni nella vitalità di cellule rispondenti possono essere rivelate tramite conta delle cellule e/o altri metodi noti a quelli esperti nella tecnica per dare dati di vitalità di cellule rispondenti.

Le regioni codificanti per proteina di geni reporter tipicamente codificano per una o più proteine rivelabili. Proteine

rivelabili si riferiscono a qualunque proteina capace di rivelazione attraverso uno o più metodi noti nella tecnica. Tali metodi di rivelazione possono includere, ma non sono limitati a Western blotting, ELISA, saggi per attività enzimatica di proteine rivelabili (ad es. attività di catalasi, attività di  $\beta$ -galattosidasi e/o attività di luciferasi,) rivelazione immunocitochimica, rivelazione di risonanza plasmonica di superficie e/o rivelazione di proteine rivelabili fluorescenti. Quando un gene reporter viene usato in un saggio, l'espressione di proteine rivelabili è correlata con la capacità dei fattori che vengono sottoposti a saggio di attivare il promotore presente nel gene reporter. In forme di realizzazione comprendenti saggi di rilascio/attività del fattore di crescita, promotori del gene reporter tipicamente rispondono alla segnalazione del fattore di crescita. In tali forme di realizzazione, il livello di proteina rivelabile prodotta è correlato con il livello di segnalazione del fattore di crescita, indicando rilascio e/o attività di un dato fattore di crescita.

In alcune forme di realizzazione, i geni reporter codificano per enzimi luciferasi. Reazioni chimiche tra enzimi luciferasi e molecole substrato sono reazioni che emettono luce. Per via di tali reazioni che emettono luce, livelli di enzima luciferasi possono essere quantificati attraverso l'aggiunta di molecole substrato e successiva foto-rivelazione della luce emessa. In alcune forme di realizzazione, geni reporter della presente invenzione codificano per luciferasi di lucciola, la cui sequenza è stata clonata da *Photinus pyralis*. In alcune forme di realizzazione, cellule rispondenti della presente invenzione comprendono geni reporter che esprimono luciferasi con promotori che sono rispondenti ai fattori di crescita. In tali forme di realizzazione, l'attività della luciferasi può essere in correlazione con i livelli di attività del fattore di crescita permettendo all'attività e/o al rilascio dai GPC del fattore di crescita di essere determinati.

In alcune forme di realizzazione, i geni reporter sono inseriti in plasmidi batterici per permettere la replicazione e/o facilitare l'introduzione nelle cellule. In alcune forme di realizzazione, tali plasmidi sono progettati per comprendere sequenze codificanti per prodotti genici rivelabili e possono essere manipolati per inserire sequenze promotore che possono essere rispondenti a uno o più fattori di interesse. Questi plasmidi sono riferiti nella presente come plasmidi reporter. In alcune forme di realizzazione della presente invenzione, promotori che possono essere rispondenti a uno o più fattori di interesse possono essere inseriti nei plasmidi reporter, a monte di

sequenze codificanti per prodotti genici rivelabili per formare geni reporter funzionali all'interno di tali plasmidi reporter. Plasmidi reporter che comprendono almeno un gene reporter funzionale sono riferiti nella presente come costrutti reporter. In alcune forme di realizzazione, costrutti reporter della presente invenzione possono comprendere plasmidi reporter pGL2 (Promega BioSciences, LLC, Madison, WI), plasmidi reporter pGL3 (Promega BioSciences, LLC, Madison, WI), plasmidi reporter pGL4 (Promega BioSciences, LLC, Madison, WI) o varianti degli stessi. Tali costrutti reporter esprimono luciferasi di lucciola in risposta all'attivazione del promotore.

In alcune forme di realizzazione, i costrutti reporter possono essere introdotti direttamente nelle cellule di espressione o possono essere introdotti in una o più cellule rispondenti. Cellule rispondenti della presente invenzione comprendenti uno o più geni reporter sono riferite nella presente come cellule reporter. In alcune forme di realizzazione, le cellule reporter possono essere transientemente trasfettate con costrutti reporter o possono comprendere l'espressione stabile di tali costrutti (ad es. i costrutti reporter sono replicati con successo insieme con DNA genomico durante ogni ciclo di divisione cellulare). Linee cellulari che comprendono stabilmente costrutti reporter sono riferite nella presente come linee cellulari reporter. In alcune forme di realizzazione, le cellule reporter sono di mammifero. In alcune forme di realizzazione, le cellule reporter possono comprendere cellule murine, cellule di coniglio, cellule di ratto, cellule di scimmia, cellule di criceto e cellule umane. In alcune forme di realizzazione, linee cellulari utili per l'espressione transiente e/o stabile di geni reporter possono includere, ma non sono limitate a cellule HEK293, cellule HeLa, cellule Sw-480, cellule TMLC [come descritto da Abe et al (Abe, M. et al., An assay for transforming growth factor- $\beta$  using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Analytical Biochemistry*. 1994. 216:276-84,)] cellule 293T/17, cellule Hs68, cellule CCD1112sk, cellule HFF-1, Fibroblasti cheloidei, cellule A204, cellule L17 RIB [come descritto da Cash et al (Cash, J.N et al., The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding. *The EMBO Journal*. 2009. 28:2662-76,)] cellule C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> e cellule T di linfoma EL4.

In forme di realizzazione dove una o più cellule reporter e/o linee cellulari reporter vengono utilizzate, tali cellule possono essere coltivate con cellule di espressione come parte di un sistema di co-coltura. In alcune forme di

realizzazione cellule reporter/linee cellulari reporter possono essere coltivate separatamente dalle cellule di espressione. In tali forme di realizzazione, lisati e/o terreni da cellule di espressione possono essere combinati con colture di cellule reporter/linee cellulari reporter per valutare i fattori espressi (inclusenti, ma non limitati ai fattori di crescita).

In alcune forme di realizzazione, i saggi basati su cellule della presente invenzione possono comprendere solamente cellule di espressione e cellule non rispondenti. In tali forme di realizzazione, le proteine espresse, includenti ma non limitate a GPC e/o fattori di crescita, possono essere rivelate tramite uno o più metodi che non sono basati su cellule. Tali metodi possono includere, ma non sono limitati a Western Blotting, saggio immunoassorbente legato ad un enzima (ELISA), immunocitochimica, risonanza plasmonica di superficie ed altri metodi noti nella tecnica per la rivelazione di proteine. In alcune forme di realizzazione, il rilascio di TGF- $\beta$  in colture cellulari di espressione e/o terreno di coltura può essere rivelato tramite ELISA. In alcune forme di realizzazione, tali saggi possono utilizzare anticorpo anti-TGF- $\beta$ , anticorpo clone 1D11 (R&D Systems, Minneapolis, MN) come anticorpo di cattura, capace di riconoscimento di isoforme di TGF- $\beta$  1, 2 e 3 in molteplici specie, includenti, ma non limitate a mucche, polli, topi ed esseri umani. In alcune forme di realizzazione, IgY di pollo anti-TGF- $\beta$ 1 biotinilato (BAF240; R&D Systems, Minneapolis, MN) può essere usato come anticorpo di rivelazione. In alcune forme di realizzazione, il rilascio di GDF-8/miostatina in colture di cellule di espressione e/o terreno di coltura può essere rivelato tramite ELISA. In alcune forme di realizzazione, può essere usato il GDF-8/myostatin quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). Esempi di anticorpi anti-GDF-8/miostatina che possono essere usati per la rivelazione includono AF1539, MAB788 e AF788 (R&D Systems, Minneapolis, MN.)

In alcune forme di realizzazione, i geni reporter della presente invenzione comprendono promotori rispondenti a fattore di crescita. Come usato nella presente, il termine "promotore rispondente a fattore di crescita" si riferisce a un promotore di gene che facilita la trascrizione di un gene a valle in risposta alla segnalazione cellulare di un fattore di crescita indotta da uno o più fattori di crescita. In alcune forme di realizzazione, promotori rispondenti a fattore di crescita sono rispondenti a segnalazione di fattore di crescita membro della famiglia del TGF- $\beta$ . In alcune

forme di realizzazione, i promotori rispondenti a fattore di crescita della presente invenzione comprendono una o più sequenze elencate nella Tabella 16 o loro frammenti o varianti. Questi includono due versioni del promotore dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno tipo 1 (PAI-1) [V1 come descritto da Abe et al (Abe, M. et al., An assay for transforming growth factor- $\beta$  using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. Analytical Biochemistry. 1994. 216:276-84) e V2 come descritto in WO 2011/034935], un promotore di collagene, tipo 1, alfa 1, un promotore di collagene, tipo 1, alfa 2, un promotore di FoxP3, un promotore di CAGA12 [rispondente alla segnalazione dipendente da Smad come reporter da Thies et al (Thies, R.S. et al., GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. Growth Factors. 2001. 18:251-9) e un promotore tardivo maggiore di adenovirus.

Tabella 16. Promotori rispondenti a fattore di crescita

Promotore	Sequenza	SEQ ID NO
PAI-1 (V1)	AGCTTACCATGGTAACCCCTGGTCCCGTTCAGCCACCACCACC CACCCAGCACACCTCCAACCTCAGCCAGACAAGGTTGTTGACA CAAGAGAGCCCTCAGGGGCACAGAGAGAGTCTGGACACGTGG GGAGTCAGCCGTGTATCATCGGAGGGCGCCGGGCACATGGCAG GGATGAGGGAAAGACCAAGAGTCTCTGTTGGGCCCAAGTCCT AGACAGACAAAACCTAGACAATCACGTGGCTGGCTGCATGCCT GTGGCTGTTGGGCTGGGCAGGAGGAGGGAGGGGCGCTCTTTCC TGGAGGTGGTCCAGAGCACCGGGTGGACAGCCCTGGGGGAAA ACTTCCACGTTTTGATGGAGGTTATCTTTGATAACTCCACAGTG ACCTGGTTCGCCAAAGGAAAAGCAGGCAACGTGAGCTGTTTTT TTTTCTCCAAGCTGAACACTAGGGGTCTAGGCTTTTTGGGT ACCCGGCATGGCAGACAGTCAACCTGGCAGGACATCCGGGAG AGACAGACACAGGCAGAGGGCAGAAAGGTCAAGGGAGGTTCT CAGGCCAAGGCTATTGGGGTTTGCTCAATTGTTCTGAATGCTC TTACACACGTACACACACAGAGCAGCACACACACACACACA CATGCCTCAGCAAGTCCCAGAGAGGGAGGTGTGAGGGGGAC CCGCTGGCTGTTCAGACGGAATCCCAGAGCCAGTGAGTGGGTG GGGCTGGAACATGAGTTCATCTATTCTGCCACATCTGGTAT AAAAGGAGGCAGTGGCCACAGAGGAGCACAGCTGTGTTTGG CTGCAGGGCCAAGAGCGCTGTCAAGAAGACCCACACGCCCCC TCCAGCAGCTG	258
PAI-1 (V2)	TTGGTCTCCTGTTTCCTTACCAAGCTTTTACCATGGTAACCCCTG GTCCCGTTCAGCCACCACCACCCACCCAGCACACCTCCAACCT CAGCCAGACAAGGTTGTTGACACAAGAGAGCCCTCAGGGGCAC AGAGAGAGTCTGGACACGTGGGGAGTCAGCCGTGTATCATCGG AGGCGGCCGGGCACATGGCAGGGATGAGGGAAAGACCAAGAG TCCTCTGTTGGGCCCAAGTCCTAGACAGACAAAACCTAGACAA TCACGTGGCTGGCTGCATGCCCTGTGGCTGTTGGGCTGGGCCA GGAGGAGGGAGGGGCGCTCTTTCTGGAGGTGGTCCAGAGCAC CGGTGGACAGCCCTGGGGGAAAACCTCCACGTTTTGATGGAG GTTATCTTTGATAACTCCACAGTGACCTGGTTCGCCAAAGGAA AAGCAGGCAACGTGAGCTGTTTTTTTTTCTCCAAGCTGAACAC TAGGGTCTAGGCTTTTTGGGTCACCCGGCATGGCAGACAGT CAACCTGGCAGGACATCCGGGAGAGACAGACACAGGCAGAGG GCAGAAAGGTCAAGGGAGGTTCTCAGGCCAAGGCTATTGGGGT TTGCTCAATTGTTCTGAATGCTTTACACACGTACACACACAG AGCAGCACACACACACACACACATGCCTCAGCAAGTCCCAG AGAGGGAGGTGTGAGGGGGACCCGCTGGCTGTTTCAGACGGA CTCCAGAGCCAGTGAGTGGTGGGGCTGGAACATGAGTTCAT CTATTTCTGCCACATCTGGTATAAAAGGAGGCAGTGGCCCA CAGAGGAGCACAGCTGTGTTGGCTGCAGGGCCAAGAGCGCTG TCAAGAAGACCCACACGCCCCCTCCAGCAGCTGAATTCCTGC AGCTCAGCAGCCGCCAGAGCAGGACGAACCGCCAATCGC AAGGCACCTCTGAGAACTTCAGGTA	259

Col1A1	<p>CCATGGCAAACAAAACCTCTTCTCTAAGTCACCAATGATCACAG  GCCTCCCCTAAAAATACTCCCAACTCTGGGGTGGAAAGAGTT  TGGGGGATGAATTTTTAGGGGATTGCAAGCCCAATCCCCACC  TCTGTGTCCCTAGAATCCCCACCCCTACCTTGGCTGCTCCATC  ACCCAACCACAAAGCTTTCTTCTGCAGAGGCCACCTAGTCAT  GTTTCTACCCTGCACCTCAGCCTCCCCACTCCATCTCTCAATC  ATGCCTAGGGTTTGGAGGAAGGCATTTGATTCTGTTCTGGAGCA  CAGCAGAAGAATTGACATCCTCAAAATTAACCTCCCTTGCT  GCACCCCTCCCTCAGATATCTGATTCTTAATGTCTAGAAAGGAA  TCTGTAAATTGTTCCCCAAATATTCCTAAGCTCCATCCCCTAGC  CACACCAGAAGACACCCCCAAACAGGCACATCTTTTAATTCC  CAGCTTCTCTGTTTTGGAGAGGTCTCAGCATGCCTCTTTATG  CCCCTCCCTAGCTCTTGCCAGGATATCAGAGGGTGACTGGGG  CACAGCCAGGAGGACCCCTCCCCAACACCCCAACCCTTCCA  CCTTTGGAAGTCTCCCCACCCAGCTCCCCAGTTCCCCAGTTCCA  CTTCTCTAGATTGGAGGTCCCAGGAAGAGAGCAGAGGGGCAC  CCCTACCACCTGGTTAGCCACGCCATTCTGAGGACCCAGCTGC  ACCCCTACCACAGCACCTCTGGCCCAGGCTGGGCTGGGGGGCT  GGGGAGGCAGAGCTGCGAAGAGGGGAGATGTGGGGTGGACTC  CCTTCCCTCCTCCTCCCCCTCTCCATTCCAACCTCCAAATTGGG  GGCCGGGCAGGCAGCTCTGATTGGCTGGGGCACGGGCGGCCG  GCTCCCCCTCTCCGAGGGGCAGGGTTCTCCTGCTCTCCATCA  GGACAGTATAAAAGGGGCCCGGGCCAGTCGTCGGAGCAGACG  GGAGTTTCTCCTCGGGGTCGGAGCAGGAGGCACGCGGAGTGTG  AGGCCACGCATGAGCGGACGCTAACCCCTCCCCAGCCACAAA  GAGTCTACATG</p>	260
Col1A2	<p>TAGAGTTCGCAAAGCCTATCCTCCCTGTAGCCGGGTGCCAAGC  AGCCTCGAGCCTGCTCCCCAGCCACCTGCCAACAAAAGGCGC  CCTCCGACTGCAACCCAGCCCTCCACAGACAGGACCCGCCCTT  TCCCCAAGTCATAAGACAAAGAGAGTGCATCACTGCTGAAACA  GTGGGCGCACACGAGCCCCAAAGCTAGAGAAAAGCTGGACGG  GGTGGGGGCGGGGTGCAGGGGTGGAGGGGCGGGGAGGCGGG  CTCCGGCTGCGCCACGCTATCGAGTCTTCCCTCCCTCCTTCTCT  GCCCCCTCCGCTCCCGCTGGAGCCCTCCACCCTACAAGTGGCCT  ACAGGGCACAGGTGAGGCGGGACTGGACAGCTCCTGCTTTGAT  CGCCGAGATCTGCAAATTCTGCCATGTCGGGGCTGCAGAGC  ACTCCGACGTGTCCATAGTGTTCCAAACCTGGAAAGGGCGG  GGGAGGGCGGGAGGATGCGGAGGGCGGAGGTATGCAGACAAC  GAGTCAGAGTTTTCCCTTGAAAGCCTCAAAAGTGTCCACGTCTT  CAAAAAGAATGGAACCAATTTAAGAAGCCAGCCCCGTGGCCAC  GTCCCTTCCCCATTGCTCCCTCCTCTGCGCCCCCGCAGGCTC  CTCCCAGCTGTGGCTGCCCCGGCCCCCAGCCCCAGCCCTCCCAT  TGGTGGAGGCCCTTTTGGAGGCACCCTAGGGCCAGGAAACTT  TTGCCGTATAAATAGGGCAGATCCGGGCTTTATTATTTTAGCAC  CACGGCAGCAGGAGGTTTCGGCTAAGTTGGAGGTAAGTGGCCAC  GACTGCATGCCCGCGCCCGCCAGGTGATACCTCCGCCGGTGAC  CCAGGGGCTCTGCGACACAAGGAGTCTGCATGTCTAAGTGCTA  GACATGCTCAGCTTTGTGGATACGCGGACTTTGTTGCTGCTTGC  AGTAA</p>	261

FoxP3	AGTAAAAGACCCCAAAGGCTGAGGGCCTCAGAAGCATCAGGC CATGATGTTCCCTGAAACAAGAGGGTCAAGGTCCTCCAATGGGCCT CTGGGGTTCATCGTGAGGATGGATGCATTAATATTGGGGACCT GCTAGGGACCTTCCCAGTGGGACAGTGGCTGGGTCAGGGCACT CAAGCCCTAAAACGTGATGAGGCGAGACTTTTCTCTTTTCCTC ATTCAGTAACTGTCAGTAGATTCTGGGAGCCAGGGATTCTCCG ACTTCTCAAGTCCATGAATTTAGGGGATGACAGTGGGCTCTCC GCTTCTCCTCCATGAAGTAACTTACATGCCCCCTCACCTCTGT GGGAGGGGTGTTGCAGGGGGTGCAGAACTCCCCCTCGCCGGGTA GTTCAAGCAATGGGGACCATATCAATTCCATCTATAGGGAAAC TGAGGCCTGGAGTAGGGCGAGGCCTCTGGGAACCCAGCCCTAT TCTGTCTTTTCCCTGGCATTTCCTCCATCCACACATAGAGCTTCA GATTCTCTTTCTTTCCCAGAGACCCTCAAATATCCTCTCACTC ACAGAATGGTGTCTCTGCCTGCCTCGGGTGGCCCTGTGATTTA TTTTAGTTCTTTTCCCTTGTTTTTTTTTTTTCAAACCTATAACACT TTGTTTTTAAAAACTGTGGTTTCTCATGAGCCCTATTATCTCATT GATACCTCTCACCTCTGTGGTGAGGGGAAGAAATCATATTTTCA GATGACTCGTAAAGGGCAAAGAAAAAAACCCAAAATTTCAA ATTTCCGTTTAAAGTCTCATAATCAAGAAAAGGAGAAACACAGA GAGAGAGAAAAAAAACCTATGAGAACCCCCCCCCACCCCGT GATTATCAGCGCACACACTCATCGAAAAAAATTTGGATTATTA GAAGAGAGAGGTCTGCGGCTTCCACACCGTACAGCGTGGTTTT TCTTCTCGGTATAAAAAGCAAAGTTGTTTTTGATACGTGACAGTT TCCCACAAGCCAGGCTGATCCTTTTCTGTCAGTCCACTTCACCA	262
CAGA12	AGCCAGACAAGCCAGACAAGCCAGACAAGCCAGACAAGCCAG ACAAGCCAGACAAGCCAGACAAGCCAGACAAGCCAGACAAGC CAGACAAGCCAGACAAGCCAGACA	263
Promotore tardivo maggiore adenovirus	GGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCACTCTCTT CCG	264

In alcune forme di realizzazione, possono essere usate linee cellulari epiteliali di polmone di visone/reporter PAI. Le cellule epiteliali di polmone di visone non producono TGF- $\beta$ , ma esprimono alti livelli di recettori per il TGF- $\beta$  (Munger et al). Le linee cellulari epiteliali di polmone di visone/ reporter PAI comprendono costrutti reporter comprendenti elementi promotore dai geni PAI e/o COL1A rispondenti a TGF- $\beta$  che modulano l'espressione della porzione codificante per proteina del gene della luciferasi. In alcune forme di realizzazione, altri costrutti reporter possono essere usati con cellule epiteliali di polmone di visone. In alcune forme di realizzazione, possono essere usati costrutti reporter rispondenti a SMAD3.

#### *Saggio di rilascio di TGF- $\beta$ 2*

In alcuni casi, la presente descrizione fornisce saggi per rivelare il rilascio e/o l'attività di TGF- $\beta$ 2. Tali saggi possono comprendere linee cellulari (ad es. cellule HEK293, cellule 293T/17, cellule Hs68, cellule CCD112sk, cellule HFF-1, Fibroblasti cheloidi o cellule Sw-480) che esprimono GPC comprendenti TGF- $\beta$ 2 (ad es.

naturalmente e/o attraverso trasfezione, trasfezione stabile, e/o trasduzione) e/o proteina ricombinante e/o chimerica derivata dello stesso. In alcuni casi, fattori aggiuntivi vengono espressi in e/o combinati con cellule esprimenti TGF- $\beta$ 2 per determinare il loro effetto sul rilascio del fattore di crescita TGF- $\beta$ 2. In alcuni casi, possono essere espresse. Integrine. In alcuni casi, può essere espressa integrina  $\alpha_9\beta_1$ .

In alcuni casi, il rilascio di TGF- $\beta$ 2 può essere rivelato tramite uno o più saggi di rilascio del fattore di crescita secondo quelli descritti nella presente. In alcuni casi, tali saggi possono comprendere l'uso di linee cellulari epiteliali di polmone di visone /reporter PAI per misurare il rilascio e/o l'attività di TGF- $\beta$ 2. In alcuni casi, saggi di rilascio di TGF- $\beta$ 2 possono essere usati per effettuare lo screening di anticorpi per proprietà inibitorie e/o attivanti per quanto riguarda il rilascio di TGF- $\beta$ 2 dai GPC e/o l'attività

#### *Saggio di induzione di $T_{reg}$*

Le cellule  $T_{reg}$  sono cellule immunitarie che comprendono una importante funzione di cellula soppressore nel regolare l'autoimmunità. Tali cellule sono derivate da cellule precursore dopo l'induzione del gene FoxP3 (Wood and Sakaguchi, Nature Reviews, 2003). FoxP3 è un fattore di trascrizione, la cui espressione può essere regolata a un certo grado da proteine correlate a TGF- $\beta$ . Wan e Flavell (2005) hanno dimostrato che in risposta a TGF- $\beta$  esogeno, le cellule T primarie attivate mostrano FoxP3 de novo e espressione proteica fluorescente "knocked-in" e induzione di funzione di cellula soppressore. Tone et al (2008) hanno dimostrato che importanti elementi enhancer rispondenti a TGF- $\beta$  che guidano l'espressione di FoxP3 in cellule T primarie sono presenti nella linea di linfoma T EL4. In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce costrutti reporter comprendenti elementi promotore dal gene FoxP3 che modulano l'espressione di tali costrutti reporter (riferiti nella presente come costrutti reporter FoxP3-guidati). In alcune forme di realizzazione, costrutti reporter FoxP3-guidati comprendono elementi promotore rispondenti a attività di segnalazione cellulare di proteine correlate a TGF- $\beta$ . In alcune forme di realizzazione, costrutti reporter FoxP3-guidati vengono introdotti (transientemente e/o stabilmente) in una o più cellule e/o linee cellulari. Tali cellule sono riferite nella presente come cellule reporter FoxP3-guidate. In alcune forme di realizzazione, tali cellule sono di mammifero. In alcune forme di realizzazione, tali cellule di mammifero possono includere, ma non sono limitate a cellule di topo, cellule di coniglio, cellule di

ratto, cellule di scimmia, cellule di criceto e cellule umane. Tali cellule possono essere derivate da una linea cellulare. In alcune forme di realizzazione, possono essere usate cellule umane. In alcune forme di realizzazione, le linee cellulari possono includere, ma non sono limitate a cellule HEK293, cellule HeLa, cellule Sw-480, cellule di linfoma T EL4, cellule TMLC, cellule 293T/17, cellule Hs68, cellule CCD1112sk, cellule HFF-1, Fibroblasti cheloidei, cellule A204, cellule L17 RIB e cellule C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. In alcune forme di realizzazione, possono essere usate cellule di linfoma T EL4. È noto che cellule di linfoma T EL4 comprendono elementi enhancer trascrizionali che sono rispondenti alla segnalazione di proteine correlate a TGF- $\beta$ . In alcune forme di realizzazione, cellule reporter FoxP3-guidate possono essere usate per effettuare lo screening di anticorpi per la loro capacità di attivare e/o inibire l'espressione genica dipendente da FoxP3.

#### *Saggi di proliferazione*

In alcune forme di realizzazione, saggi basati su cellule della presente invenzione possono comprendere saggi di proliferazione. Come usato nella presente, il termine "saggio di proliferazione" si riferisce a un saggio che determina l'effetto su uno o più agenti su proliferazione cellulare.

In alcuni casi, saggi di proliferazione possono comprendere saggi di proliferazione di HT2. Tali saggi possono essere effettuati, ad esempio, secondo i metodi descritti in Tsang, M. et al., 1995. Cytokine 7(5):389-97. Cellule HT2 (ATCC CRL-1841) vengono cresciute in presenza di IL-2, in cui sono insensibili a TGF- $\beta$ 1 nei terreni di coltura. Quando le cellule HT2 vengono passate in terreni contenenti IL-4 esse continueranno a proliferare, ma risponderanno a TGF- $\beta$ 1 nei terreni di coltura tramite induzione di apoptosi. Nei terreni contenenti IL-4, la morte cellulare dovuta a TGF- $\beta$ 1 nei terreni di coltura si verifica in una modalità dipendente dalla dose, che può essere bloccata tramite numerosi reagenti che interferiscono con il pathway di segnalazione di TGF- $\beta$ . Ciò permette l'uso di questo saggio per effettuare lo screening di reagenti per modulare l'attivazione di TGF- $\beta$ 1.

La rivelazione di variazioni nel numero delle cellule può essere effettuata, in alcune forme di realizzazione, attraverso la rivelazione e/o la quantificazione di livelli di ATP nelle cellule. I livelli di ATP tipicamente sono in correlazione con il numero di cellule presenti in un dato campione da testare, pozzetto, piastra o piatto. In alcune forme di realizzazione, i livelli di ATP possono essere determinati utilizzando un CELLTITER-GLO®

Luminescent Cell Viability Assay (Promega BioSciences, LLC, Madison, WI).

*Kit e Dispositivi*

Qualunque dei composti e/o delle composizioni della presente invenzione possono essere compresi in un kit. In un esempio non limitante, reagenti per generare composti e/o composizioni, includenti molecole di antigene sono inclusi in uno o più kit. In alcune forme di realizzazione, i kit possono inoltre includere reagenti e/o istruzioni per creare e/o sintetizzare composti e/o composizioni della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, i kit possono anche includere uno o più tamponi. In alcune forme di realizzazione, i kit dell'invenzione possono includere componenti per produrre arrays o librerie di proteine o acido nucleico e pertanto, possono includere, ad esempio, supporti solidi.

In alcune forme di realizzazione, componenti di kit possono essere confezionati o in mezzi acquosi o in forma liofilizzata. I mezzi contenitori dei kit generalmente includeranno almeno una fiala, una provetta per analisi, una fiasca, una bottiglia, una siringa o un altro mezzo contenitore, in cui un componente può essere messo, e preferibilmente, appropriatamente aliquotato. Dove vi sono più di un componente di kit, (reagente per marcatura e marcatore possono essere confezionati insieme), generalmente i kit possono anche contenere un secondo, un terzo o altri contenitori aggiuntivi in cui i componenti aggiuntivi possono essere messi separatamente. In alcune forme di realizzazione, i kit possono comprendere anche un secondo mezzo contenitore per contenere tamponi e/o altri diluenti sterili, farmaceuticamente accettabili. In alcune forme di realizzazione, varie combinazioni di componenti possono essere comprese in una o più fiale. Kit della presente invenzione possono anche tipicamente includere mezzi per contenere composti e/o composizioni della presente invenzione, ad es., proteine, acidi nucleici, e qualunque altro contenitore di reagente in stretto confinamento per vendita commerciale. Tali contenitori possono includere un'iniezione o contenitori di plastica stampati per soffiatura in cui sono conservate le fiale desiderate.

In alcune forme di realizzazione, i componenti di kit sono forniti in una e/o più soluzioni liquide. In alcune forme di realizzazione, le soluzioni liquide sono soluzioni acquose, con soluzioni acquose sterili essendo in particolare preferite. In alcune forme di realizzazione, componenti di kit possono essere forniti come polvere/i secca/secche. Quando reagenti e/o componenti sono forniti come polveri secche, tali polveri possono essere ricostituite tramite

l'aggiunta di volumi di solvente adatti. In alcune forme di realizzazione, è immaginato che in un altro mezzo contenitore possano essere anche forniti i solventi. In alcune forme di realizzazione, coloranti marcatori sono forniti come polveri secche. In alcune forme di realizzazione, è contemplato che 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 microgrammi o almeno o al massimo quelle quantità di colorante secco siano fornite nei kit dell'invenzione. In tali forme di realizzazione, il colorante può poi essere risospeso in qualunque solvente adatto, quale DMSO.

In alcune forme di realizzazione, i kit possono includere istruzioni per impiegare componenti di kit come pure l'uso di qualunque altro reagente non incluso nel kit. Le istruzioni possono includere variazioni che possono essere realizzate.

In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere combinati con, rivestiti su o incorporati in un dispositivo. I dispositivi possono includere, ma non sono limitati a, impianti dentali, stent, sostituzioni di osso, articolazioni artificiali, valvole, pacemaker e/o altro dispositivo terapeutico impiantabile.

### *Definizioni*

In vari punti nella presente descrizione, sostituenti di composti della presente descrizione sono descritti in gruppi o in range. È specificamente inteso che la presente descrizione include tutte le singole sotto-combinazioni dei membri di tali gruppi e range. Il seguente è un elenco non limitante di definizioni dei termini.

*Attività:* Come usato nella presente, il termine "attività" si riferisce alla condizione in cui le cose stanno avvenendo o si stanno facendo. Composizioni dell'invenzione possono avere attività e questa attività può implicare uno o più eventi biologici. In alcune forme di realizzazione, tale evento biologico può implicare fattori di crescita e/o segnalazione dei fattori di crescita. In alcune forme di realizzazione, gli eventi biologici possono includere eventi cellulari di segnalazione associati con interazioni di fattore di crescita e recettore. In alcune forme di realizzazione, gli eventi biologici possono includere eventi cellulari di segnalazione associati con interazioni di TGF- $\beta$  o proteine correlate a TGF- $\beta$  con uno o più recettori corrispondenti.

*Somministrato in combinazione:* Come usato nella presente, il termine "somministrato in combinazione" o

"somministrazione combinata" si riferisce alla simultanea esposizione di uno o più soggetti a due o più agenti somministrati nello stesso tempo o in un intervallo in modo tale che il soggetto sia in qualche punto nel tempo esposto simultaneamente a ambedue e/o tale che vi possa essere una sovrapposizione nell'effetto di ogni agente sul paziente. In alcune forme di realizzazione, almeno una dose di uno o più agenti viene somministrata entro circa 24 ore, 12 ore, 6 ore, 3 ore, 1 ora, 30 minuti, 15 minuti, 10 minuti, 5 minuti, o 1 minuto da almeno una dose di uno o più altri agenti. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione si verifica in regimi posologici sovrapposti. Come usato nella presente, il termine "regime posologico" si riferisce a una pluralità di dosi distanziate l'una dall'altra nel tempo. Tali dosi possono avvenire a intervalli regolari o possono includere una o più interruzioni nella somministrazione. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione di singole dosi di uno o più composti e/o composizioni della presente invenzione, come descritte nella presente, è distanziata sufficientemente ravvicinata in modo tale da ottenere un effetto combinatorio (ad es., uno sinergico).

*Animale:* Come usato nella presente, il termine "animale" si riferisce a qualunque membro del regno animale. In alcune forme di realizzazione, "animale" si riferisce a esseri umani in qualunque stadio di sviluppo. In alcune forme di realizzazione, "animale" si riferisce a animali non umani in qualunque stadio di sviluppo. In certe forme di realizzazione, l'animale non umano è un mammifero (*ad es.*, un roditore, un topo, un ratto, un coniglio, una scimmia, un cane, un gatto, una pecora, un bovino, un primate, o un maiale). In alcune forme di realizzazione, gli animali includono, ma non vi si limitano, mammiferi, uccelli, rettili, anfibi, pesci, e vermi. In alcune forme di realizzazione, l'animale è un animale transgenico, un animale geneticamente ingegnerizzato, o un clone.

*Antigeni di interesse o antigeni desiderati:* Come usato nella presente, i termini "antigeni di interesse" o "antigeni desiderati" si riferisce a quelle proteine e/o altre biomolecole fornite nella presente che sono legate immunospecificamente o interagiscono con anticorpi della presente invenzione e/o frammenti, mutanti, varianti, e/o modificazioni degli stessi descritti nella presente. In alcune forme di realizzazione, gli antigeni di interesse possono comprendere proteine correlate a TGF- $\beta$ , fattori di crescita, prodomini, GPC, moduli proteici o regioni di sovrapposizione tra di loro.

*Approssimativamente:* Come usato nella presente, il termine "approssimativamente" o "circa," come applicato a

uno o più valori di interesse, si riferisce a un valore che è simile a un valore di riferimento affermato. In certe forme di realizzazione, il termine "approssimativamente" o "circa" si riferisce a un range di valori che rientrano nel 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o meno nell'una o nell'altra direzione (maggiore o minore) del valore di riferimento affermato a meno che non affermato altrimenti o altrimenti evidente dal contesto (eccetto dove tale numero supererebbe il 100% di un valore possibile).

*Associato con:* Come usato nella presente, i termini "associato con", "coniugato", "legato", "attaccato", e "connesso", quando usati rispetto a due o più porzioni, significano che le porzioni sono fisicamente associate o connesse l'una con l'altra, direttamente o tramite una o più porzioni aggiuntive che servono come agenti di collegamento, per formare una struttura che è sufficientemente stabile in modo tale che le porzioni rimangano fisicamente associate nelle condizioni in cui viene usata la struttura, ad es., in condizioni fisiologiche. Una "associazione" non deve essere strettamente attraverso legame chimico covalente diretto. Essa può anche suggerire legame ionico o idrogeno o una connettività basata su ibridazione sufficientemente stabile in modo tale che le entità "associate" rimangano fisicamente associate.

*Biomolecola:* Come usato nella presente, il termine "biomolecola" è qualunque molecola naturale che è basata su amminoacidi, basata su acidi nucleici, basata su carboidrati o basata su lipidi, e simili.

*Biologicamente attivo:* Come usato nella presente, la frase "biologicamente attivo" si riferisce a una caratteristica di qualunque sostanza che ha attività in un sistema biologico e/o un organismo. Ad esempio, una sostanza che, quando somministrata a un organismo, ha un effetto biologico su quell'organismo, si ritiene che sia biologicamente attiva. In particolari forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione possono essere considerati biologicamente attivi se anche una loro porzione è biologicamente attiva o mima un'attività considerata biologicamente pertinente.

*Sistema biologico:* Come usato nella presente, il termine "sistema biologico" si riferisce a un gruppo di organi, tessuti, cellule, componenti intracellulari, proteine, acidi nucleici, molecole (incluse, ma non limitate a biomolecole) che funzionano insieme per svolgere un certo compito biologico all'interno di membrane cellulari,

compartimenti cellulari, cellule, tessuti, organi, sistemi di organi, organismi multicellulari, o qualunque entità biologica. In alcune forme di realizzazione, i sistemi biologici sono pathway di segnalazione cellulare comprendenti biomolecole di segnalazione cellulare intracellulare e/o extracellulare. In alcune forme di realizzazione, i sistemi biologici comprendono eventi di segnalazione di fattori di crescita all'interno della matrice extracellulare, della matrice cellulare e/o di nicchie cellulari.

*Anticorpo candidato:* Come usato nella presente, il termine "anticorpo candidato" si riferisce a un anticorpo da un pool di uno o più anticorpi da cui possono essere selezionati uno o più anticorpi desiderati.

*Matrice cellulare:* Come usato nella presente, il termine "matrice cellulare" si riferisce all'ambiente biochimico e strutturale associato con la porzione esterna della membrana cellulare. Tali membrane cellulari possono anche includere membrane piastriniche. Componenti della matrice cellulare possono includere, ma non sono limitati a proteoglicani, molecole di carboidrato, proteine integrali della membrana, glicolipidi e simili. In alcuni casi, i componenti della matrice cellulare possono includere fattori di crescita e/o modulatori dell'attività dei fattori di crescita. Alcune proteine cellulari della matrice includono integrine, GARP e LRRC33.

*Composto:* Come usato nella presente, il termine "composto," si riferisce a un'entità chimica distinta. Il termine può essere usato nella presente per riferirsi a peptidi, proteine, complessi di proteine o anticorpi dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, un particolare composto può esistere in una o più forme isomeriche o isotopiche (includenti, ma non limitate a stereoisomeri, isomeri geometrici e isotopi). In alcune forme di realizzazione, un composto è fornito o utilizzato in solamente una singola tale forma. In alcune forme di realizzazione, un composto è fornito o utilizzato come una miscela di due o più tali forme (includenti, ma non limitate a una miscela racemica di stereoisomeri). Quelli di esperienza nella tecnica si rendono conto che alcuni composti esistono in differenti tali forme, mostrano differenti proprietà e/o attività (includenti, ma non limitate a attività biologiche). In tali casi è nell'ordinaria esperienza di quelli nella tecnica selezionare o evitare particolari forme del composto per uso in accordo con la presente invenzione. Ad esempio, composti che contengono atomi di carbonio asimmetricamente sostituiti possono essere isolati in forme otticamente attive o forme racemiche. Metodi su come preparare forme otticamente attive da materiali di partenza otticamente attivi sono noti nella tecnica, quale tramite risoluzione di

miscele racemiche o tramite sintesi stereoselettiva.

*Conservati:* Come usato nella presente, il termine "conservati" si riferisce a nucleotidi o residui amminoacidici di sequenze polinucleotidiche o polipeptidiche, rispettivamente, che sono quelli che si mantengono inalterati nella stessa posizione di due o più sequenze che vengono confrontate. Nucleotidi o amminoacidi che sono relativamente conservati sono quelli che sono conservati tra sequenze più correlate di nucleotidi o amminoacidi che compaiono altrove nelle sequenze.

In alcune forme di realizzazione, si dice che due o più sequenze sono "completamente conservate" se sono il 100% identiche l'una all'altra. In alcune forme di realizzazione, si dice che due o più sequenze sono "altamente conservate" se sono almeno il 70% identiche, almeno l'80% identiche, almeno il 90% identiche, o almeno il 95% identiche l'una all'altra. In alcune forme di realizzazione, si dice che due o più sequenze sono "altamente conservate" se sono circa il 70% identiche, circa l'80% identiche, circa il 90% identiche, circa il 95%, circa il 98%, o circa il 99% identiche l'una all'altra. In alcune forme di realizzazione, si dice che due o più sequenze sono "conservate" se sono almeno il 30% identiche, almeno il 40% identiche, almeno il 50% identiche, almeno il 60% identiche, almeno il 70% identiche, almeno l'80% identiche, almeno il 90% identiche, o almeno il 95% identiche l'una all'altra. In alcune forme di realizzazione, si dice che due o più sequenze sono "conservate" se sono circa il 30% identiche, circa il 40% identiche, circa il 50% identiche, circa il 60% identiche, circa il 70% identiche, circa l'80% identiche, circa il 90% identiche, circa il 95% identiche, circa il 98% identiche, o circa il 99% identiche l'una all'altra. La conservazione delle sequenze si può applicare all'intera lunghezza di un oligonucleotide o un polipeptide o si può applicare a una porzione, una regione o una caratteristica dello stesso.

In una forma di realizzazione, le sequenze conservate non sono contigue. Quelli esperti nella tecnica sono in grado di capire come ottenere l'allineamento quando sono presenti gap in un allineamento contiguo tra sequenze, e come allineare i residui corrispondenti nonostante le inserzioni o le delezioni presenti.

*Veicolazione:* Come usato nella presente, "veicolazione" si riferisce all'atto o al modo di veicolare un composto, una sostanza, un'entità, una porzione, un carico o un carico utile.

*Agente di veicolazione:* Come usato nella presente, "agente di veicolazione" si riferisce a qualunque agente che

facilita, almeno in parte, la veicolazione *in vivo* di una o più sostanze (includenti, ma non limitate a composti e/o composizioni della presente invenzione) a una cellula, un soggetto o a altre cellule di un sistema biologico.

*Anticorpo desiderato*: Come usato nella presente, il termine "anticorpo desiderato" si riferisce a un anticorpo che viene ricercato, in alcuni casi da un pool di anticorpi candidati.

*Destabilizzato*: Come usato nella presente, il termine "destabilizzabile", "destabilizzano", o "regione destabilizzante" significa una regione o una molecola che è meno stabile di una forma di partenza, di riferimento, wild-type o nativa della stessa regione o molecola.

*Marcatore rivelabile*: Come usato nella presente, "marcatore rivelabile" si riferisce a uno o più marcatori, segnali, o porzioni che sono attaccati, incorporati o associati con un'altra entità, i quali marcatori, segnali o porzioni sono facilmente rivelati tramite metodi noti nella tecnica includenti radiografia, fluorescenza, chemiluminescenza, attività enzimatica, assorbanza, rivelazione immunologica e simili. Marcatori rivelabili possono includere radioisotopi, fluorofori, cromofori, enzimi, coloranti, ioni metallici, ligandi, biotina, avidina, streptavidina e apteni, punti quantici, poliistidina tag, myc tag, flag tag, emoagglutinina (HA) di influenza umana tag e simili. I marcatori rivelabili possono essere situati in qualunque posizione nell'entità alla quale sono attaccati, incorporati o associati. Ad esempio, quando attaccati a, incorporati in o associati con un peptide o una proteina, essi possono essere all'interno degli amminoacidi, dei peptidi, o delle proteine, o situati negli N- o C-terminali.

*Distale*: Come usato nella presente, il termine "distale" significa situato distante dal centro o distante da un punto o una regione di interesse.

*Ingegnerizzato*: Come usato nella presente, forme di realizzazione dell'invenzione sono "ingegnerizzate" quando è progettato che abbiano una caratteristica o una proprietà, strutturale o chimica, che varia da una molecola wild type o nativa punto di partenza. Pertanto, agenti o entità ingegnerizzati sono quelli la cui progettazione e/o produzione include un atto della mano dell'uomo.

*Epitopo*: Come usato nella presente, un "epitopo" si riferisce a una superficie o una regione su una molecola che è capace di interagire con componenti del sistema immunitario, includenti, ma non limitati a anticorpi. In alcune forme di realizzazione, quando si fa riferimento a una proteina o un modulo proteico, un epitopo può comprendere

un tratto lineare di amminoacidi o una struttura tridimensionale formata da catene amminoacidiche ripiegate.

*Espressione:* Come usato nella presente, "espressione" di una sequenza di acido nucleico si riferisce a uno o più dei seguenti eventi: (1) produzione di un template di RNA da una sequenza di DNA (ad es., tramite trascrizione); (2) processamento di un trascritto di RNA (ad es., tramite splicing, editing, aggiunta di cappuccio al 5', e/o processamento di estremità al 3'); (3) traduzione di un RNA in un polipeptide o una proteina; (4) ripiegamento di un polipeptide o una proteina; e (5) modificazione post-traduzionale di un polipeptide o una proteina.

*Matrice extracellulare:* Come usato nella presente, il termine, "matrice extracellulare," o "ECM" si riferisce all'area che circonda le cellule e/o all'area tra le cellule che tipicamente comprende proteine strutturali come pure molecole di segnalazione cellulare. Componenti della matrice extracellulare possono includere, ma non sono limitati a proteine, acidi nucleici, membrane, lipidi e zuccheri che possono essere direttamente o indirettamente associati con componenti strutturali delle condizioni ambientali extracellulari. Componenti strutturali della matrice extracellulare possono includere, ma non sono limitati a proteine, polisaccaridi (ad es. acido ialuronico), glicosamminoglicani e proteoglicani (ad es. eparina solfato, condroitina solfato e cheratina solfato). Tali componenti strutturali possono includere, ma non sono limitati a componenti fibrosi (ad es. collagene e elastine), fibrilline, fibronectina, laminine, agrina, perlecano, decorina e simili. Altre proteine che possono essere componenti della matrice extracellulare includono e LTBP. Componenti della matrice extracellulare possono anche includere fattori di crescita e/o modulatori di attività dei fattori di crescita.

*Caratteristica:* Come usato nella presente, una "caratteristica" si riferisce a una caratteristica, una proprietà, o un elemento distintivo.

*Formulazione:* Come usato nella presente, una "formulazione" include almeno un composto e/o una composizione della presente invenzione e un agente di veicolazione.

*Frammento:* Un "frammento," come usato nella presente, si riferisce a una porzione. Per esempio, frammenti di proteine possono comprendere polipeptidi ottenuti tramite digestione di una proteina a lunghezza intera isolata da cellule coltivate. In alcune forme di realizzazione, un frammento di una proteina include almeno 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200,

250 o più amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, frammenti di un anticorpo includono porzioni di un anticorpo sottoposte a digestione enzimatica o sintetizzate come tali.

*Funzionale:* Come usato nella presente, una molecola biologica "funzionale" è un'entità biologica con una struttura e in una forma in cui esibisce una proprietà e/o un'attività da cui è caratterizzata.

*Omologia:* Come usato nella presente, il termine "omologia" si riferisce alla relazionalità complessiva tra molecole polimeriche, *ad esempio* tra molecole di acido nucleico (ad es. molecole di DNA e/o molecole di RNA) e/o tra molecole di polipeptide. In alcune forme di realizzazione, si ritiene che le molecole polimeriche sono "omologhe" l'una all'altra se le loro sequenze sono almeno 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% identiche o simili. Il termine "omologo" necessariamente si riferisce a un confronto tra almeno due sequenze (sequenze polinucleotidiche o polipeptidiche). In accordo con l'invenzione, due sequenze polinucleotidiche sono considerate omologhe se i polipeptidi che codificano sono almeno circa 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o anche 99% per almeno un tratto di almeno circa 20 amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, le sequenze polinucleotidiche omologhe sono caratterizzate dalla capacità di codificare per un tratto di almeno 4-5 amminoacidi specificati in modo univoco. Per sequenze polinucleotidiche di meno di 60 nucleotidi in lunghezza, l'omologia è tipicamente determinata dalla capacità di codificare un tratto di almeno 4-5 amminoacidi specificati in modo univoco. In accordo con l'invenzione, due sequenze proteiche sono considerate omologhe se le proteine sono almeno circa 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% identiche per almeno uno tratto di almeno circa 20 amminoacidi. In molte forme di realizzazione, la proteina omologa può mostrare un ampio grado complessivo di omologia e un alto grado di omologia su almeno un breve tratto di almeno 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o più amminoacidi. In molte forme di realizzazione, le proteine omologhe condividono uno o più elementi di sequenza caratteristici. Come usato nella presente, il termine "elemento di sequenza caratteristico" si riferisce a un motivo presente in proteine correlate. In alcune forme di realizzazione, la presenza di tali motivi è correlata con una particolare attività (quale attività biologica).

*Identità:* Come usato nella presente, il termine "identità" si riferisce alla relazionalità complessiva tra molecole polimeriche, *ad esempio*, tra molecole oligonucleotidiche (ad es. molecole di DNA e/o molecole di RNA) e/o tra

molecole polipeptidiche. Il calcolo della percentuale di identità di due sequenze polinucleotidiche, ad esempio, può essere compiuto allineando le due sequenze per scopi di confronto ottimale (ad es., possono essere introdotti gap in una o ambedue di una prima e una seconda sequenza di acido nucleico per un allineamento ottimale e sequenze non identiche possono essere trascurate a scopo di confronto). In certe forme di realizzazione, la lunghezza di una sequenza allineata a scopo di confronto è almeno 30%, almeno 40%, almeno 50%, almeno 60%, almeno 70%, almeno 80%, almeno 90%, almeno 95%, o 100% della lunghezza della sequenza di riferimento. I nucleotidi in posizioni nucleotidiche corrispondenti vengono poi confrontati. Quando una posizione nella prima sequenza è occupata dallo stesso nucleotide della posizione corrispondente nella seconda sequenza, allora le molecole sono identiche in quella posizione. La percentuale di identità tra le due sequenze è una funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze, prendendo in considerazione il numero di gap, e la lunghezza di ogni gap, che deve essere introdotto per un allineamento ottimale delle due sequenze. Il confronto delle sequenze e la determinazione della percentuale di identità tra due sequenze possono essere realizzati utilizzando un algoritmo matematico. Ad esempio, la percentuale di identità tra due sequenze nucleotidiche può essere determinata utilizzando metodi quali quelli descritti in *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Computer Analysis of Sequence Data, Parte I*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; e *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; ognuno dei quali è incorporato nella presente per riferimento. Ad esempio, la percentuale di identità tra due sequenze nucleotidiche può essere determinata, ad esempio utilizzando l'algoritmo di Meyers e Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), che è stato incorporato nel programma ALIGN (versione 2.0) utilizzando una tabella di residui in peso PAM120, una penalità per lunghezza di gap di 12 e una penalità per gap di 4. La percentuale di identità tra due sequenze nucleotidiche può, in alternativa, essere determinata utilizzando il programma GAP nel pacchetto software GCG utilizzando una matrice NWSgapdna.CMP. Metodi comunemente impiegati per determinare la percentuale di identità tra sequenze includono, ma non sono limitati a quelli descritti in Carillo, H., and Lipman,

D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988); incorporato nella presente per riferimento. Tecniche per determinare l'identità sono codificate in programmi informatici pubblicamente disponibili. Un software informatico esemplare per determinare l'omologia tra due sequenze include, ma non vi si limita, il pacchetto di programmi GCG, Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, e FASTA Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990)).

*Inibire l'espressione di un gene:* Come usato nella presente, la frase "inibire l'espressione di un gene" significa causare una riduzione nella quantità di un prodotto di espressione del gene. Il prodotto di espressione può essere RNA trascritto dal gene (ad es. mRNA) o un polipeptide tradotto da mRNA trascritto dal gene. Tipicamente una riduzione nel livello di mRNA ha come risultato una riduzione nel livello di un polipeptide tradotto dallo stesso. Il livello di espressione può essere determinato utilizzando tecniche standard per misurare mRNA o proteina.

*In vitro:* Come usato nella presente, il termine "*in vitro*" si riferisce a eventi che si verificano in un ambiente artificiale, *ad esempio*, in una provetta per analisi o in un recipiente di reazione, in coltura cellulare, in una piastra di Petri, *etc.*, piuttosto che all'interno di un organismo (ad es., animale, pianta, o microbo).

*In vivo:* Come usato nella presente, il termine "*in vivo*" si riferisce a eventi che si verificano all'interno di un organismo (ad es., animale, pianta, o microbo o cellula o tessuto degli stessi).

*Isolato:* Come usato nella presente, il termine "isolato" è sinonimo con "separato", ma porta con sé la deduzione che è stata effettuata una separazione per mano dell'uomo. In una forma di realizzazione, una sostanza o un'entità isolata è una che è stata separata da almeno alcuni dei componenti con cui era precedentemente associata (in natura o in un ambiente sperimentale). Le sostanze isolate possono avere livelli di purezza variabili in riferimento alle sostanze da cui sono state associate. Sostanze e/o entità isolate possono essere separate da almeno circa 10%, circa 20%, circa 30%, circa 40%, circa 50%, circa 60%, circa 70%, circa 80%, circa 90%, o più degli altri componenti con cui erano inizialmente associate. In alcune forme di realizzazione, gli agenti isolati sono più di circa 80%, circa 85%, circa 90%, circa 91%, circa 92%, circa 93%, circa 94%, circa 95%, circa 96%, circa 97%, circa 98%, circa 99%, o più di circa 99% puri. Come usato nella presente, una sostanza è "pura" se è sostanzialmente priva di altri componenti.

*Sostanzialmente isolato:* Con "sostanzialmente isolato" si intende che il composto è sostanzialmente separato dall'ambiente in cui è stato formato o rivelato. Separazione parziale può includere, ad esempio, una composizione arricchita nel composto della presente descrizione. Una sostanziale separazione può includere composizioni contenenti almeno circa 50%, almeno circa 60%, almeno circa 70%, almeno circa 80%, almeno circa 90%, almeno circa 95%, almeno circa 97%, o almeno circa 99% in peso del composto della presente descrizione, o un sale dello stesso. Metodi per isolare composti e loro sali sono di routine nella tecnica. In alcune forme di realizzazione, l'isolamento di una sostanza o un'entità include la rottura di associazioni e/o legami chimici. In alcune forme di realizzazione, l'isolamento include solamente la separazione da componenti con cui la sostanza o l'entità isolata era precedentemente combinata e non include tale rottura.

*Linker:* Come usato nella presente, un linker si riferisce a una porzione che connette due o più domini, porzioni o entità. In una forma di realizzazione, un linker può comprendere 10 o più atomi. In un'ulteriore forma di realizzazione, un linker può comprendere un gruppo di atomi, ad esempio, 10-1000 atomi, e può essere composto dagli atomi o gruppi quali, ma non limitati a, carbonio, ammino, alchilammino, ossigeno, zolfo, solfossido, solfonile, carbonile, e immina. In alcune forme di realizzazione, un linker può comprendere uno o più acidi nucleici comprendenti uno o più nucleotidi. In alcune forme di realizzazione, il linker può comprendere un amminoacido, un peptide, un polipeptide o una proteina. In alcune forme di realizzazione, una porzione legata tramite un linker può includere, ma non è limitata a un atomo, un gruppo chimico, un nucleoside, un nucleotide, una nucleobase, uno zucchero, un acido nucleico, un amminoacido, un peptide, un polipeptide, una proteina, un complesso di proteine, un carico utile (ad es., un agente terapeutico) o un marcatore (includente, ma non limitato a un marcatore chimico, fluorescente, radioattivo o bioluminescente). Il linker può essere usato per qualunque scopo utile, quale formare multimeri o coniugati, come pure somministrare un carico utile, come descritto nella presente. Esempi di gruppi chimici che possono essere incorporati nel linker includono, ma non vi si limitano, alchile, alchenile, alchinile, ammido, ammino, etere, tioetere, estere, alchilene, eteroalchilene, arile, o eterocicliche, ognuno dei quali può essere facoltativamente sostituito, come descritto nella presente. Esempi di linker includono, ma non vi si limitano, alcani insaturi, polietilene glicoli (ad es., unità monomeriche di etilene o propilene glicole, ad esempio,

dietilene glicole, dipropilene glicole, trietilene glicole, tripropilene glicole, tetraetilene glicole, o tetraetilene glicole), e polimeri di destrano, Altri esempi includono, ma non vi si limitano, porzioni clivabili all'interno del linker, quali, ad esempio, un legame disolfuro (-S-S-) o un legame azo (-N=N-), che possono essere clivati utilizzando un agente riducente o fotolisi. Esempi non limitanti di legami selettivamente clivabili includono un legame ammidico che può essere clivato ad esempio tramite l'uso di tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP), o altri agenti riducenti, e/o tramite fotolisi, come pure un legame estere che può essere clivato ad esempio tramite idrolisi acida o basica.

*Modificato:* Come usato nella presente, il termine "modificato" si riferisce a uno stato o una struttura cambiata di una molecola o un'entità rispetto a una molecola o un'entità parentale o di riferimento. Le molecole possono essere modificate in molte modalità includenti chimiche, strutturali, e funzionali. In alcune forme di realizzazione, composti e/o composizioni della presente invenzione sono modificati tramite l'introduzione di amminoacidi non naturali.

*Mutazione:* Come usato nella presente, il termine "mutazione" si riferisce a una variazione e/o una modificazione. In alcune forme di realizzazione, le mutazioni possono essere variazioni e/o modificazioni a proteine (includenti peptidi e polipeptidi) e/o acidi nucleici (includenti acidi polinucleici). In alcune forme di realizzazione, le mutazioni comprendono variazioni e/o modificazioni a una sequenza di proteina e/o acido nucleico. Tali variazioni e/o modificazioni possono comprendere l'aggiunta, la sostituzione e/o la delezione di uno o più amminoacidi (nel caso di proteine e/o peptidi) e/o nucleotidi (nel caso di acidi nucleici e/o acidi polinucleici). In forme di realizzazione in cui le mutazioni comprendono l'aggiunta e/o la sostituzione di amminoacidi e/o nucleotidi, tali aggiunte e/o sostituzioni possono comprendere 1 o più residui amminoacidici e/o nucleotidici e possono includere amminoacidi e/o nucleotidi modificati.

*Esistente in natura:* Come usato nella presente, "esistente in natura" significa esistente in natura senza un aiuto artificiale, o il coinvolgimento della mano dell'uomo.

*Nicchia:* Come usato nella presente, il termine "nicchia" si riferisce a un punto, una zona e/o un habitat. In alcune forme di realizzazione, le nicchie comprendono nicchie cellulari. Come usato nella presente, il termine "nicchia

cellulare" si riferisce a un set unico di condizioni fisiologiche in un sistema cellulare all'interno di un tessuto, un organo o un sistema di organi all'interno di o derivato da un organismo mammifero. Una nicchia cellulare può verificarsi *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, o *in situ*. Data la natura complessa e i processi dinamici implicati nella segnalazione dei fattori di crescita, una nicchia cellulare può essere caratterizzata funzionalmente, spazialmente o temporalmente o può essere usata per riferirsi a qualunque ambiente che comprende una o più cellule. Come tale, in alcune forme di realizzazione una nicchia cellulare include l'ambiente di qualunque cellula adiacente a un'altra cellula che fornisce supporto, quale ad esempio una cellula nutrice. In alcune forme di realizzazione, le nicchie possono includere quelle descritte nelle Domande di Brevetto Provvisorie degli Stati Uniti 61/722,919, depositata il 6 Novembre 2012 e 61/722,969, depositata il 6 Novembre 2012.

*Vertebrato non umano*: Come usato nella presente, un "vertebrato non umano" include tutti i vertebrati eccetto l'*Homo sapiens*, incluse specie selvatiche e addomesticate. Esempi di vertebrati non umani includono, ma non vi si limitano, mammiferi, quali alpaca, banteng, bisonte, cammello, gatto, bovini, cervo, cane, asino, gayal, capra, porcellino d'india, cavallo, lama, mulo, maiale, coniglio, renna, pecore, bufalo d'acqua, e yak.

*Fuori-bersaglio*: Come usato nella presente, "fuori-bersaglio" si riferisce a qualunque effetto non intenzionale su uno qualunque o più, geni e/o trascritti cellulari bersagli.

*Operativamente legato*: Come usato nella presente, la frase "operativamente legato" si riferisce a una connessione funzionale tra due o più molecole, costrutti, trascritti, entità, porzioni o simili.

*Paratopo*: Come usato nella presente, un "paratopo" si riferisce al sito di legame con l'antigene di un anticorpo.

*Adsorbimento passivo*: Come usato nella presente, "adsorbimento passivo" si riferisce a un metodo di immobilizzazione di reagenti di fase solida su una o più superfici (ad es. membrane, piastre, piastre per coltura, piastre per saggio, etc.). L'immobilizzazione tipicamente si verifica per via di affinità tra tali reagenti e componenti della superficie.

*Paziente*: Come usato nella presente, "paziente" si riferisce a un soggetto che può ricercare o essere nella necessità di trattamento, richiede trattamento, sta ricevendo trattamento, riceverà trattamento, o un soggetto che è sotto cura da un professionista addestrato (ad es., autorizzato) per una particolare malattia o condizione.

*Peptide:* Come usato nella presente, il termine "peptide" si riferisce a una catena di amminoacidi che è meno lunga di o uguale a circa 50 amminoacidi, ad esempio, lunga circa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 amminoacidi.

*Farmaceuticamente accettabile:* La frase "farmaceuticamente accettabile" è impiegata nella presente per riferirsi a quei composti, materiali, composizioni, e/o forme di dosaggio che sono, nell'ambito di un valido giudizio medico, adatti per uso a contatto con i tessuti di esseri umani e animali senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica, o altro problema o complicazione, commisurati con un rapporto rischio/beneficio ragionevole.

*Eccipienti farmaceuticamente accettabili:* Come usato nella presente, il termine "eccipiente farmaceuticamente accettabile", come usato nella presente, si riferisce a qualunque ingrediente diverso dagli agenti attivi (ad es., come descritto nella presente) presente nelle composizioni farmaceutiche e avente le proprietà di essere sostanzialmente non tossico e non infiammatorio nei soggetti. In alcune forme di realizzazione, gli eccipienti farmaceuticamente accettabili sono veicoli capaci di sospendere e/o dissolvere gli agenti attivi. Gli eccipienti possono includere, ad esempio: antiaderenti, antiossidanti, leganti, rivestimenti, coadiuvanti di compressione, disintegranti, coloranti (colori), emollienti, emulsionanti, riempitivi (diluenti), filmogeni o rivestimenti, aromi, fragranze, glidanti (potenziatori di flusso), lubrificanti, preservanti, inchiostri da stampa, assorbenti, agenti sospendenti o disperdenti, edulcoranti, ed acque idratanti. Eccipienti esemplari includono, ma non sono limitati a: butilato idrossitoluene (BHT), calcio carbonato, calcio fosfato (dibasico), calcio stearato, croscarmellosa, polivinilpirrolidone reticolato, acido citrico, crospovidone, cisteina, etilcellulosa, gelatina, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, lattosio, magnesio stearato, maltitolo, mannitolo, metionina, metilcellulosa, metilparaben, cellulosa microcristallina, polietilenglicole, polivinilpirrolidone, povidone, amido pregelatinizzato, propilparaben, retinile palmitato, gommalacca, biossido di silicio, sodio carbossimetilcellulosa, sodio citrato, sodio amido glicolato, sorbitolo, amido (mais), acido stearico, saccarosio, talco, diossido di titanio, vitamina A, vitamina E, vitamina C, e xilitolo.

*Sali farmaceuticamente accettabili:* Sali farmaceuticamente accettabili dei composti descritti nella presente sono forme dei composti descritti in cui la porzione acido o base è nella sua forma di sale (ad es., come generato facendo reagire un gruppo base libera con un acido organico adatto). Esempi di sali farmaceuticamente accettabili

includono, ma non vi si limitano, sali di acidi minerali o organici di residui basici quali ammine; sali alcalini o organici di residui acidi quali acidi carbossilici; e simili. Sali di addizione di acido rappresentativi includono sali acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenesolfonato, benzoato, bisolfato, borato, butirrato, canforato, canforsolfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsolfato, etanosolfonato, fumarato, glucoeptonato, glicerofosfato, emisolfato, eptonato, esanoato, bromidrato, cloridrato, iodidrato, 2-idrossi-etanosolfonato, lattobionato, lattato, laurato, laurile solfato, malato, maleato, malonato, metanosolfonato, 2-naftalenesolfonato, nicotinato, nitrato, oleato, ossalato, palmitato, pamoato, pectinato, persolfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, stearato, succinato, solfato, tartrato, tiocianato, toluenesolfonato, undecanoato, valerato, e simili. Sali di metalli alcalini o alcalino-terrosi rappresentativi includono sodio, litio, potassio, calcio, magnesio, e simili, come pure cationi non tossici ammonio, ammonio quaternario, e ammina, includenti, ma non limitati a ammonio, tetrametilammonio, tetraetilammonio, metilammina, dimetilammina, trimetilammina, trietilammina, etilammina, e simili. Sali farmaceuticamente accettabili includono i sali non tossici convenzionali, ad esempio, da acidi organici o inorganici non tossici. In alcune forme di realizzazione un sale farmaceuticamente accettabile viene preparato da un composto progenitore che contiene una porzione basica o acida tramite metodi chimici convenzionali. Generalmente, tali sali possono essere preparati facendo reagire le forme libere di acido o base di questi composti con una quantità stechiometrica della base o dell'acido appropriati in acqua o in un solvente organico, o in una miscela dei due; generalmente, si preferiscono mezzi non acquosi come etere, acetato di etile, etanolo, isopropanolo, o acetonitrile. Elenchi di sali adatti si trovano in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, e Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977).

*Solvato farmaceuticamente accettabile:* Il termine "solvato farmaceuticamente accettabile", come usato nella presente, si riferisce a una forma cristallina di un composto in cui molecole di un solvente adatto sono incorporate nel reticolo cristallino. Ad esempio, i solvati possono essere preparati tramite cristallizzazione, ricristallizzazione, o precipitazione da una soluzione che include solventi organici, acqua, o una miscela degli stessi. Esempi di

solventi adatti sono etanolo, acqua (ad es., mono-, di-, e tri-idrati), *N*-metilpirrolidinone (NMP), dimetilsolfossido (DMSO), *N,N'*-dimetilformammide (DMF), *N,N'*-dimetilacetammide (DMAC), 1,3-dimetil-2-imidazolidinone (DMEU), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetraidro-2-(1H)-pirimidinone (DMPU), acetonitrile (ACN), propilene glicole, acetato di etile, alcol benzilico, 2-pirrolidone, benzile benzoato, e simili. Quando l'acqua è il solvente, il solvato è riferito come un "idrato". In alcune forme di realizzazione, il solvente incorporato in un solvato è di un tipo o ad un livello che è fisiologicamente tollerabile per un organismo al quale il solvato viene somministrato (ad es., in una forma di dosaggio unitario di una composizione farmaceutica).

*Farmacocinetica:* Come usato nella presente, "farmacocinetica" si riferisce a una qualunque o più proprietà di una molecola o un composto quando riguarda la determinazione del destino di sostanze somministrate a organismi viventi. La farmacocinetica è divisa in diverse aree includenti il grado e il tasso di assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione. Ciò viene comunemente riferito come ADME dove: (A) Assorbimento è il processo di una sostanza che entra nella circolazione sanguigna; (D) la distribuzione è la dispersione o la disseminazione di sostanze attraverso i fluidi e i tessuti del corpo; (M) il metabolismo (o la biotrasformazione) è la trasformazione irreversibile di composti parentali in metaboliti figli; e (E) Escrezione (o Eliminazione) si riferisce all'eliminazione delle sostanze dal corpo. In rari casi, alcuni farmaci si accumulano irreversibilmente nel tessuto corporeo.

*Fisicochimica:* Come usato nella presente, "fisicochimica" significa di o relativo a una proprietà fisica e/o chimica.

*Prevenzione:* Come usato nella presente, il termine "prevenzione" si riferisce a ritardare parzialmente o completamente l'insorgenza di una infezione, una malattia, un disordine e/o una condizione; ritardare parzialmente o completamente l'insorgenza di uno o più sintomi, caratteristiche, o manifestazioni cliniche di una particolare infezione, malattia, disordine, e/o condizione; ritardare parzialmente o completamente l'insorgenza di uno o più sintomi, caratteristiche, o manifestazioni di una particolare infezione, malattia, disordine, e/o condizione; ritardare parzialmente o completamente la progressione da un'infezione, una particolare malattia, disordine e/o condizione; e/o diminuire il rischio di sviluppare patologia associata con l'infezione, la malattia, il disordine, e/o la condizione.

*Profarmaco:* La presente descrizione include anche profarmaci dei composti descritti nella presente. Come usato nella presente, "profarmaci" si riferisce a qualunque sostanza, molecola o entità che è in una forma affermata

perchè quella sostanza, molecola o entità agisca come terapeutico su modificazione chimica o fisica. I profarmaci possono essere covalentemente legati o sequestrati in qualche modo fino a quando non vengono convertiti nella porzione di farmaco attiva prima della, al momento della o dopo la somministrazione a un soggetto mammifero. I profarmaci possono essere preparati modificando gruppi funzionali presenti nei composti in modo tale che le modificazioni siano clivate, in una manipolazione di routine o *in vivo*, nei composti progenitori. I profarmaci includono composti in cui gruppi idrossile, ammino, sulfidrilici, o carbossilici sono legati a qualunque gruppo che, quando somministrato a un soggetto mammifero, si cliva per formare un gruppo idrossile, ammino, sulfidrilico, o carbossilico libero rispettivamente. La preparazione e l'uso di profarmaci è discusso in T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 della A.C.S. Symposium Series, e in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

*Proliferare*: Come usato nella presente, il termine "proliferare" significa crescere, espandersi, replicarsi o aumentare o causare la crescita, l'espansione, la replicazione o l'aumento. "Proliferativo" significa avere la capacità di proliferare. "Anti-proliferativo" significa avere proprietà contrarie o opposte alle proprietà proliferative.

*Proteina di interesse*: Come usato nella presente, i termini "proteine di interesse" o "proteine desiderate" includono quelle fornite nella presente e frammenti, mutanti, varianti, e modificazioni delle stesse.

*Prossimale*: Come usato nella presente, il termine "prossimale" significa situato più vicino al centro o a un punto o a una regione di interesse.

*Purificato*: Come usato nella presente, il termine "purificare" significa rendere sostanzialmente puro o chiarificato da componenti indesiderati, contaminazione da materiale, mescolanza o imperfezione. "Purificato" si riferisce allo stato di essere puro. "Purificazione" si riferisce al processo di rendere puro.

*Regione*: Come usato nella presente, il termine "regione" si riferisce a una zona o un'area generale. In alcune forme di realizzazione, quando si fa riferimento a una proteina o un modulo proteico, una regione può comprendere una sequenza lineare di amminoacidi lungo la proteina o il modulo proteico o può comprendere un'area tridimensionale, un epitopo e/o un cluster di epitopi. In alcune forme di realizzazione, le regioni comprendono regioni terminali. Come usato nella presente, il termine "regione terminale" si riferisce a regioni localizzate alle

estremità o ai terminali di un dato agente. Quando si fa riferimento alle proteine, le regioni terminali possono comprendere N- e/o C-terminali. Gli N-terminali si riferiscono all'estremità di una proteina comprendente un amminoacido con un gruppo amminico libero. I C-terminali si riferiscono all'estremità di una proteina comprendente un amminoacido con un gruppo carbossile libero. Regioni N- e/o C-terminali possono perciò comprendere gli N- e/o C-terminali come pure gli amminoacidi circostanti. In alcune forme di realizzazione, regioni N- e/o C-terminali comprendono da circa 3 amminoacidi a circa 30 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 40 amminoacidi, da circa 10 amminoacidi a circa 50 amminoacidi, da circa 20 amminoacidi a circa 100 amminoacidi e/o almeno 100 amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, le regioni N-terminali possono comprendere qualunque lunghezza di amminoacidi che include l'N-terminale, ma non include il C-terminale. In alcune forme di realizzazione, le regioni C-terminali possono comprendere qualunque lunghezza di amminoacidi, che includono il C-terminale, ma non comprendono l'N-terminale.

*Regione di riconoscimento di anticorpo:* Come usato nella presente, il termine "regione di riconoscimento di anticorpo" si riferisce a una o più regioni su uno o più antigeni o tra due o più antigeni che sono specificamente riconosciute e legate da anticorpi corrispondenti. In alcune forme di realizzazione, le regioni di riconoscimento di anticorpo possono comprendere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o almeno 10 residui amminoacidici. In alcune forme di realizzazione, le regioni di riconoscimento di anticorpo comprendono una giunzione tra due proteine o tra due domini della stessa proteina che sono in stretta prossimità l'uno con l'altro.

*Campione:* Come usato nella presente, il termine "campione" si riferisce a un'aliquota o una porzione presa da una fonte e/o fornita per analisi o processamento. In alcune forme di realizzazione, un campione è da una fonte biologica quale un tessuto, una cellula o una parte componente (ad es. un fluido corporeo, includente ma non limitato a sangue, muco, liquido linfatico, liquido sinoviale, liquido cerebrospinale, saliva, liquido amniotico, sangue di cordone amniotico, urina, liquido vaginale e sperma). In alcune forme di realizzazione, un campione può essere o comprendere un omogenato, un lisato o un estratto preparato da un organismo intero o un sottoinsieme di suoi tessuti, cellule o parti componenti, o una frazione o una porzione degli stessi, includenti ma non limitati a, ad esempio, plasma, siero, liquido spinale, liquido linfatico, le sezioni esterne della pelle, tratti respiratorio,

intestinale, e genitourinario, lacrime, saliva, latte, cellule del sangue, tumori, organi. In alcune forme di realizzazione, un campione è o comprende un terreno, quale un brodo nutriente o gel, che può contenere componenti cellulari, quali proteine o molecola di acido nucleico. In alcune forme di realizzazione, un campione "primario" è un'aliquota della fonte. In alcune forme di realizzazione, un campione primario è sottoposto a uno o più passi di processamento (ad es., separazione, purificazione, etc). per preparare un campione per analisi o per altro uso.

*Sequenze segnale:* Come usato nella presente, la frase "sequenze segnale" si riferisce a una sequenza che può dirigere il trasporto o la localizzazione di una proteina.

*Singola dose unitaria:* Come usato nella presente, una "singola dose unitaria" è una dose di qualunque terapeutico somministrata in una dose/in un tempo/una singola via/un singolo punto di contatto, cioè, singolo evento di somministrazione. In alcune forme di realizzazione, una singola dose unitaria è fornita come una forma di dosaggio discreta (ad es., una compressa, una capsula, un cerotto, una siringa carica, una fiala, etc.).

*Similarità:* Come usato nella presente, il termine "similarità" si riferisce alla relazionalità complessiva tra molecole polimeriche, *ad es.* tra molecole polinucleotidiche (*ad es.* molecole di DNA e/o molecole di RNA) e/o tra molecole di polipeptide. Il calcolo della percentuale di similarità delle molecole polimeriche l'una con l'altra può essere compiuto nello stesso modo di un calcolo di percentuale di identità, eccetto che il calcolo della percentuale di similarità prende in considerazione le sostituzioni conservative come è compreso nella tecnica.

*Dose divisa:* Come usato nella presente, una "dose divisa" è la divisione di una singola dose unitaria o dose giornaliera totale in due o più dosi.

*Stabile:* Come usato nella presente "stabile" si riferisce a un composto o un'entità che è sufficientemente robusto per sopravvivere all'isolamento a un grado di purezza utile da una miscela di reazione, e preferibilmente capace di formulazione in un agente terapeutico efficace.

*Stabilizzato:* Come usato nella presente, il termine "stabilizzare", "stabilizzato", "regione stabilizzata" significa rendere o diventare stabile. In alcune forme di realizzazione, la stabilità viene misurata rispetto a un valore assoluto. In alcune forme di realizzazione, la stabilità viene misurata rispetto a un composto o un'entità di

riferimento.

*Soggetto:* Come usato nella presente, il termine "soggetto" o "paziente" si riferisce a qualunque organismo al quale può essere somministrata una composizione in accordo con l'invenzione, ad es., per scopi sperimentali, diagnostici, profilattici, e/o terapeutici. Tipici soggetti includono animali (*ad es.*, mammiferi quali topi, ratti, conigli, primati non umani, ed esseri umani) e/o piante.

*Sostanzialmente:* Come usato nella presente, il termine "sostanzialmente" si riferisce alla condizione qualitativa di esibire una misura o un grado totale o quasi totale di una caratteristica o una proprietà di interesse. Uno di ordinaria esperienza nelle tecniche biologiche comprenderà che i fenomeni biologici e chimici raramente, se mai lo fanno, vanno a completamento e/o procedono a completezza o raggiungono o evitano un risultato assoluto. Il termine "sostanzialmente" è perciò usato nella presente per catturare la potenziale mancanza di completezza intrinseca in molti fenomeni biologici e chimici.

*Sostanzialmente uguale:* Come usato nella presente quando riguarda differenze di tempo tra le dosi, il termine significa più/meno del 2%.

*Sostanzialmente simultaneamente:* Come usato nella presente e quando riguarda una pluralità di dosi, il termine tipicamente significa entro circa 2 secondi.

*Affetto da:* Un individuo che è "affetto da" una malattia, un disordine, e/o una condizione è stato diagnosticato con o presenta uno o più sintomi di una malattia, un disordine, e/o una condizione.

*Suscettibile a:* Un individuo che è "suscettibile a" una malattia, un disordine, e/o una condizione non è stato diagnosticato con la/il e/o può non esibire sintomi della/del, malattia, disordine, e/o condizione ma ha una propensione a sviluppare una malattia o suoi sintomi. In alcune forme di realizzazione, un individuo che è suscettibile a una malattia, un disordine, e/o una condizione (ad es., cancro) può essere caratterizzato da uno o più dei seguenti: (1) una mutazione genetica associata con lo sviluppo della malattia, del disordine, e/o della condizione; (2) un polimorfismo genetico associato con lo sviluppo della malattia, del disordine, e/o della condizione; (3) aumentata e/o diminuita espressione e/o attività di una proteina e/o un acido nucleico associata/o con la malattia, il disordine, e/o la condizione; (4) abitudini e/o stili di vita associati con sviluppo della malattia,

del disordine, e/o della condizione; (5) una storia familiare della malattia, del disordine, e/o della condizione; e (6) esposizione a e/o infezione con un microbo associato con sviluppo della malattia, del disordine, e/o della condizione. In alcune forme di realizzazione, un individuo che è suscettibile a una malattia, un disordine, e/o una condizione svilupperà la malattia, il disordine, e/o la condizione. In alcune forme di realizzazione, un individuo che è suscettibile a una malattia, un disordine, e/o una condizione non svilupperà la malattia, il disordine, e/o la condizione.

*Sintetico*: Il termine "sintetico" significa prodotto, preparato, e/o fabbricato dalla mano dell'uomo. La sintesi di polinucleotidi o polipeptidi o altre molecole della presente invenzione può essere chimica o enzimatica.

*Cellule mirate*: Come usato nella presente, "cellule mirate" si riferisce a una qualunque o più cellule di interesse. Le cellule si possono trovare *in vitro*, *in vivo*, *in situ* o nel tessuto o nell'organo di un organismo. L'organismo può essere un animale, preferibilmente un mammifero, più preferibilmente un essere umano e il più preferibilmente un paziente.

*Sito bersaglio*: Il termine "sito bersaglio" come usato nella presente, si riferisce a una regione o un'area mirata da un dato composto o composizione dell'invenzione. Siti bersaglio possono includere, ma non sono limitati a cellule, tessuti, organi, sistemi di organi, nicchie e simili.

*Agente terapeutico*: Il termine "agente terapeutico" si riferisce a qualunque agente che, quando somministrato a un soggetto, ha un effetto terapeutico, diagnostico, e/o profilattico e/o suscita un desiderato effetto biologico e/o farmacologico.

*Quantità terapeuticamente efficace*: Come usato nella presente, il termine "quantità terapeuticamente efficace" significa una quantità di un agente da veicolare (ad es., acido nucleico, farmaco, agente terapeutico, agente diagnostico, agente profilattico, *etc.*) che è sufficiente, quando somministrata a un soggetto affetto da o suscettibile a un'infezione, una malattia, un disordine, e/o una condizione, per trattare, migliorare sintomi di, diagnosticare, prevenire, e/o ritardare l'insorgenza dell'infezione, della malattia, del disordine, e/o della condizione. In alcune forme di realizzazione, una quantità terapeuticamente efficace è fornita in una singola dose. In alcune forme di realizzazione, una quantità terapeuticamente efficace è somministrata in un regime posologico comprendente una

pluralità di dosi. Quelli esperti nella tecnica si renderanno conto che in alcune forme di realizzazione, si può considerare che una forma di dosaggio unitario comprende una quantità terapeuticamente efficace di un particolare agente o entità se essa comprende una quantità che è efficace quando somministrata come parte di un tale regime posologico.

*Esito terapeuticamente efficace:* Come usato nella presente, il termine "esito terapeuticamente efficace" significa un esito che è sufficiente in un soggetto affetto da o suscettibile a un'infezione, una malattia, un disordine, e/o una condizione, per trattare, migliorare sintomi di, diagnosticare, prevenire, e/o ritardare l'insorgenza dell'infezione, della malattia, del disordine, e/o della condizione.

*Dose giornaliera totale:* Come usato nella presente, una "dose giornaliera totale" è una quantità data o prescritta in un periodo di 24 h. Può essere somministrata come una singola dose unitaria.

*Fattore di trascrizione:* Come usato nella presente, il termine "fattore di trascrizione" si riferisce a una proteina legante il DNA che regola la trascrizione di DNA in RNA, ad esempio, tramite attivazione o repressione di trascrizione. Alcuni fattori di trascrizione effettuano la regolazione della trascrizione da soli, mentre altri agiscono in concerto con altre proteine. Qualche fattore di trascrizione può sia attivare sia reprimere la trascrizione in certe condizioni. In generale, i fattori di trascrizione legano una specifica sequenza bersaglio o sequenze altamente simili a una specifica sequenza consenso in una regione regolatoria di un gene bersaglio. I fattori di trascrizione possono regolare la trascrizione di un gene bersaglio da soli o in un complesso con altre molecole.

*Trattare:* Come usato nella presente, il termine "trattare" si riferisce a parzialmente o completamente alleviare, migliorare, far bene a, attenuare, ritardare l'insorgenza di, inibire la progressione di, ridurre la severità di, e/o ridurre l'incidenza di uno o più sintomi o caratteristiche di una particolare infezione, malattia, disordine, e/o condizione. Ad esempio, "trattare" cancro può riferirsi a inibire sopravvivenza, crescita, e/o diffusione di un tumore. Il trattamento può essere somministrato a un soggetto che non esibisce segni di una malattia, un disordine, e/o una condizione e/o a un soggetto che esibisce solamente segni iniziali di una malattia, un disordine, e/o una condizione allo scopo di diminuire il rischio di sviluppare una patologia associata con la malattia, il disordine, e/o la condizione.

*Non modificato*: Come usato nella presente, "non modificato" si riferisce a qualunque sostanza, composto o molecola prima che sia cambiata/o in qualche modo. Non modificato può riferirsi, ma non sempre, alla forma wild-type o nativa di una biomolecola o entità. Le molecole o entità possono andare incontro a una serie di modificazioni per cui ogni prodotto modificato può servire come la molecola o entità di partenza "non modificata" per una successiva modificazione.

### **EQUIVALENTI E AMBITO**

Quelli esperti nella tecnica riconosceranno, o saranno in grado di accertare utilizzando non più di una sperimentazione di routine, molti equivalenti alle forme di realizzazione specifiche in accordo con l'invenzione descritta nella presente. L'ambito della presente invenzione non è destinato a essere limitato alla suddetta descrizione, ma piuttosto è come esposto nelle rivendicazioni allegate.

Nelle rivendicazioni, gli articoli quali "un", "uno", "una" e "il", "lo", "la" possono significare uno o più di uno a meno che non indicato al contrario o altrimenti evidente dal contesto. Le rivendicazioni o le descrizioni che includono "o" tra uno o più membri di un gruppo sono considerate soddisfatte se uno, più di uno, o tutti i membri del gruppo sono presenti, impiegati, o altrimenti rilevanti per un dato prodotto o procedimento a meno che non sia indicato al contrario o altrimenti evidente dal contesto. L'invenzione include forme di realizzazione in cui esattamente un membro del gruppo è presente, impiegato, o altrimenti rilevante per un dato prodotto o procedimento. L'invenzione include forme di realizzazione in cui più di uno, o l'intero gruppo di membri sono presenti, impiegati, o altrimenti rilevanti per un dato prodotto o procedimento.

Va anche notato che il termine "comprendente" si intende che sia aperto e permette ma non richiede l'inclusione di elementi o passi aggiuntivi. Quando il termine "comprendente" è usato nella presente, il termine "composto da" è quindi anche compreso e descritto.

Dove vengono forniti dei range, gli estremi sono inclusi. Inoltre, si deve comprendere che a meno che non indicato altrimenti o altrimenti evidente dal contesto e dalla comprensione di uno di ordinaria esperienza nella tecnica, i valori che sono espressi come range possono assumere qualunque specifico valore o subrange all'interno dei range affermati in forme di realizzazione dell'invenzione diverse, al decimo dell'unità del limite inferiore del range, a

meno che il contesto non imponga chiaramente il contrario.

Inoltre, va compreso che qualunque particolare forma di realizzazione della presente invenzione che rientra nella tecnica anteriore può essere esplicitamente esclusa da una qualunque o più delle rivendicazioni. Poiché tali forme di realizzazione sono ritenute note a uno di ordinaria esperienza nella tecnica, esse possono essere escluse anche se l'esclusione non è esplicitamente esposta nella presente. Qualunque particolare forma di realizzazione delle composizioni dell'invenzione (ad es., qualunque acido nucleico o proteina codificata dallo stesso; qualunque metodo di produzione; qualunque metodo di uso; *etc.*) può essere esclusa da una qualunque o più rivendicazioni, per qualunque ragione, indipendentemente dal fatto che sia correlata all'esistenza di tecnica anteriore.

Non si intende che i titoli delle sezioni e delle tabelle siano limitanti.

## **ESEMPI**

### **Esempio 1. Sistema di espressione di proteine**

L'espressione di proteine viene effettuata utilizzando cellule 293E. Le cellule 293E sono cellule HEK293 esprimenti stabilmente EBNA1 (antigene nucleare del virus Epstein-Barr-1). Queste cellule sono cellule umane che modificano a livello post-traduzionale proteine con strutture umano simili (ad es. glicani). Tali cellule sono facilmente trasfettabili e scalabili e sono capaci di crescere ad alte densità in coltura in sospensione. Durante la produzione delle proteine, le cellule 293E vengono cresciute in terreno senza siero per facilitare la purificazione a valle. Alcune delle proteine prodotte comprendono amminoacidi aggiuntivi codificanti per uno o più marcatori rivelabili per la purificazione [ad es. polistidina tag, flag tag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 265), *etc.*] Le proteine sono N-terminalmente, C-terminalmente marcate e/o biotinilate.

Alcune delle proteine prodotte comprendono amminoacidi aggiuntivi codificanti per uno o più siti di clivaggio per proteasi 3C (LEVLFQGP; SEQ ID NO: 266) Tali siti consentono clivaggio tra residui Q e G del sito di clivaggio per proteasi 3C su trattamento con proteasi 3C, incluso con proteasi 3C di rhinovirus. Siti di clivaggio sono introdotti per consentire la rimozione dei marcatori rivelabili dalle proteine ricombinanti.

Le sequenze codificanti per proteine ricombinanti della presente invenzione vengono clonate in vettori pTT5 (NRC Biotechnology Research Institute, Montreal, Quebec.) per la trasfezione nelle cellule. Tali vettori sono piccoli

(~4.4 kb), facilitano la trasfezione transiente, comprendono un promotore di CMV forte per una sintesi proteica robusta e comprendono una oriP per la replicazione episomale in cellule esprimenti EBNA1.

### **Esempio 2. Generazione di anticorpi**

#### *Anticorpi prodotti tramite generazione di anticorpi monoclonali standard*

Gli anticorpi vengono generati in topi knockout, mancanti del gene che codifica per gli antigeni bersaglio desiderati. Tali topi non sono tolleranti per gli antigeni bersaglio e perciò generano anticorpi contro tali antigeni che possono cross-reagire con forme umane e murine dell'antigene. Per la produzione di anticorpi monoclonali, i topi ospiti vengono immunizzati con le proteine ricombinanti per suscitare linfociti che si legano specificamente a queste proteine. I linfociti vengono raccolti e fusi con linee cellulari immortalizzate. Le cellule di ibridoma risultanti vengono coltivate in un terreno di coltura adatto con agenti di selezione per supportare la crescita delle sole cellule fuse.

Le linee cellulari di ibridoma desiderate vengono poi identificate attraverso analisi della specificità di legame degli anticorpi secreti per il peptide bersaglio e cloni di queste cellule vengono sottoclonati attraverso procedure della diluizione limite e cresciute tramite metodi standard. Anticorpi prodotti da queste cellule vengono isolati e purificati dal terreno di coltura tramite procedure di purificazione di immunoglobuline standard

#### *Anticorpi prodotti per via ricombinante*

Anticorpi ricombinanti vengono prodotti utilizzando le cellule di ibridoma prodotte sopra. Sequenze di cDNA di regione variabile di catena leggera e pesante degli anticorpi vengono determinate utilizzando tecniche biochimiche standard. RNA totale viene estratto da cellule di ibridoma producenti anticorpi e convertito in cDNA tramite trascrittasi inversa (RT) reazione a catena della polimerasi (PCR). Amplificazione per PCR viene effettuata sul cDNA risultante utilizzando primers specifici per l'amplificazione delle sequenze di catena pesante e leggera. I prodotti di PCR vengono poi sottoclonati in plasmidi per l'analisi della sequenza. Una volta sequenziate, le sequenze codificanti per gli anticorpi sono poste in vettori di espressione. Per l'umanizzazione, le sequenze codificanti per domini costanti di catena pesante e leggera umana vengono usate per sostituirle alle sequenze murine omologhe. I costrutti risultanti vengono trasfettati in cellule di mammifero capaci di traduzione su grande

scala.

*Anticorpi prodotti utilizzando tecniche di screening di librerie di esposizione di frammenti anticorpali*

Anticorpi della presente invenzione possono essere prodotti utilizzando metodi di scoperta ad alto rendimento. Gli anticorpi sintetici sono progettati tramite screening di antigeni bersaglio utilizzando una libreria di esposizione su fago. Le librerie di esposizione su fago sono composte da milioni a miliardi di particelle fagiche, ognuna esprime un frammento anticorpale Fab o un frammento variabile a singola catena (scFv) unico sul loro rivestimento virale. Nelle librerie di frammenti anticorpali Fab, il cDNA codificante per ogni frammento contiene la stessa sequenza ad eccezione di una sequenza unica codificante per i loop variabili delle regioni determinanti la complementarità (CDR). Le catene  $V_H$  delle CDR vengono espresse come una proteina di fusione, legate all'N-terminale della proteina del coat virale pIII. La catena  $V_L$  viene espressa separatamente e si assembla con la catena  $V_H$  nel periplasma prima dell'incorporazione del complesso nel coat virale. Gli antigeni bersaglio vengono incubati, *in vitro*, con i membri delle librerie di esposizione su fago e le particelle di fago legate vengono precipitate. Il cDNA codificante per le CDR delle subunità di Fab legate viene sequenziato dal fago legato. La sequenza di cDNA viene direttamente incorporata nelle sequenze di anticorpo per la produzione di anticorpi ricombinanti, o mutata ed utilizzata per ulteriore ottimizzazione attraverso maturazione di affinità *in vitro*.

*Anticorpi prodotti utilizzando tecniche di maturazione dell'affinità*

I Fab capaci di legare gli antigeni bersaglio vengono identificati utilizzando le librerie descritte sopra e mutanti ad alta affinità vengono derivati da questi attraverso il procedimento della maturazione dell'affinità. La tecnologia della maturazione dell'affinità viene usata per identificare sequenze codificanti per le CDR che hanno la più alta affinità per l'antigene bersaglio. Utilizzando questa tecnologia, le sequenze di CDR isolate utilizzando il procedimento di selezione di librerie di esposizione su fago descritte sopra vengono mutate in modo casuale nel loro complesso o in specifici residui per creare da milioni a miliardi di varianti. Queste varianti vengono espresse in proteine di fusione di frammento anticorpale Fab in una libreria di esposizione su fago e sottoposte a screening per la loro capacità di legare l'antigene bersaglio. Diversi cicli di selezione, mutazione ed espressione vengono effettuati per identificare sequenze di frammenti anticorpali con la più alta affinità per l'antigene bersaglio. Queste

sequenze possono essere direttamente incorporate in sequenze di anticorpo per la produzione di anticorpi ricombinanti.

### **Esempio 3. Identificazione e caratterizzazione di anticorpi diretti verso proteine ricombinanti**

Proteine ricombinanti vengono sintetizzate secondo il metodo di Esempio 1 o ottenute da fonti commerciali. Le proteine ricombinanti espresse includono quelle elencate nella Tabella 17.

**Tabella 17. Proteine ricombinanti**

<b>Proteina Ricombinante</b>	<b>Caratteristiche Fondamentali</b>
proTGF- $\beta$ 1 C4S	Associazione N-terminale bloccata
TGF- $\beta$ 1 LAP C4S	solo LAP associazione N-terminale bloccata
proTGF- $\beta$ 1 complessato con LTBP1S	associazione N-terminale con LTBP1 variante di splicing
TGF- $\beta$ 1 LAP + sGARP	solo LAP associazione N-terminale con GARP solubile
proTGF- $\beta$ 1 sGARP	associazione N-terminale con GARP solubile
proGDF-8	
GDF-8 prodominio	solo prodominio

Ambedue le isoforme umane e non umane (inclusenti, ma non limitate a murine) delle proteine ricombinanti elencate nella Tabella 17 vengono espresse.

Secondo i metodi descritti nell'Esempio 2 vengono generati anticorpi, che si legano alle proteine ricombinanti espresse e sono sottoposti a screening per identificare anticorpi con le desiderate proprietà di legame. Saggi ELISA vengono usati inizialmente per identificare anticorpi candidati che dimostrano affinità per gli antigeni desiderati, mostrando nel contempo affinità ridotta o assente per antigeni indesiderati.

*Identificazione di anticorpi di stabilizzazione diretti verso il TGF- $\beta$ 1 GPC*

Anticorpi diretti verso proTGF- $\beta$ 1 C4S vengono sottoposti a screening utilizzando ELISA per rivelare il legame a antigeni per selezione positiva e negativa. Gli anticorpi vengono valutati complessivamente per la loro capacità di associarsi con prodomini (con o senza ligando) e diminuire la segnalazione di TGF- $\beta$ . Le piastre ELISA vengono rivestite con neutravidina ed incubate con proteine ricombinanti proTGF- $\beta$ 1 C4S biotinilate. Per identificare ed eliminare anticorpi che si legano a elementi vari (ad es. poliistidina tag, flag tag e/o siti di clivaggio per proteinasi 3C), le piastre ELISA rivestite vengono incubate con proteine ICAM-1 umane comprendenti uno o più di tali elementi vari. Per identificare ed eliminare anticorpi che si legano a fattore di crescita TGF- $\beta$ 1 libero e/o LAP, le piastre ELISA rivestite vengono incubate con TGF- $\beta$ 1 umano LAP C4S e/o fattore di crescita TGF- $\beta$ 1. Anticorpi che possono essere specifici per versioni murine vengono identificati incubando le piastre ELISA rivestite con muproTGF- $\beta$ 1 C4S biotinilato. Le proteine ricombinanti che si associano con anticorpi legati sulle piastre ELISA vengono rivelate utilizzando anticorpi secondari coniugati con enzimi per la rivelazione (ad es. colorimetrica, fluorimetrica) che si legano a marcatori rivelabili presenti su proteine ricombinanti legate. Gli anticorpi vengono selezionati per cicli di selezione aggiuntivi o eliminati dai pool di test sulla base dei risultati ottenuti.

Gli anticorpi diretti verso proTGF- $\beta$ 1 C4S vengono inoltre valutati per la loro capacità di stabilizzare TGF- $\beta$ 1 GPC. Cellule esprimenti GPC e/o integrina  $\alpha\beta_6$  vengono incubate con gli anticorpi selezionati e i surnatanti risultanti vengono usati per trattare le colture di cellule comprendenti costrutti reporter rispondenti a TGF- $\beta$  per rivelare l'attività di espressione genica dipendente da fattore di crescita libero. Ulteriori saggi vengono effettuati per caratterizzare le regioni di riconoscimento di anticorpi legate dagli anticorpi selezionati come pure la modulazione di fattore di crescita in specifici tipi cellulari (ad es. fibroblasti e/o cellule T). Infine, stime di affinità di legame vengono fatte utilizzando esperimenti di blocco incrociato per classificare gli anticorpi come pure attraverso l'uso di strumenti di analisi di affinità, includenti, ma non limitati a strumenti della famiglia Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA). Gli anticorpi vengono inoltre selezionati in base alla loro capacità di stabilizzare isoforme di TGF- $\beta$  GPC alternative (ad es. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e/o TGF- $\beta$ 3) e TGF- $\beta$ 1 GPC da altre specie.

*Identificazione di anticorpi di rilascio diretti verso TGF- $\beta$ 1 LAP libero*

Secondo una modalità per la generazione di anticorpi di rilascio di TGF- $\beta$ 1 da GPC, anticorpi diretti verso proTGF- $\beta$ 1 LAP C4S sono sottoposti a screening utilizzando ELISA per rivelare il legame a antigeni per selezione positiva e negativa. Gli anticorpi vengono valutati complessivamente per la loro capacità di associarsi con LAP ed aumentare i livelli e/o la segnalazione di fattore di crescita libero TGF- $\beta$ 1. Le piastre ELISA vengono rivestite con neutravidina ed incubate con proteine ricombinanti proTGF- $\beta$ 1 LAP C4S biotinilate. Per identificare ed eliminare gli anticorpi che si legano a elementi vari (ad es. poliistidina tag, flag tag e/o siti di clivaggio per proteinasi 3C), le piastre ELISA rivestite vengono incubate con proteine ICAM-1 umane comprendenti uno o più di tali elementi vari. Per identificare ed eliminare gli anticorpi che si legano a fattore di crescita TGF- $\beta$ 1 libero, le piastre ELISA rivestite vengono incubate con fattore di crescita TGF- $\beta$ 1 umano. Per identificare ed eliminare gli anticorpi che si legano a TGF- $\beta$ 1 latente, le piastre ELISA rivestite vengono incubate con TGF- $\beta$ 1 C4S umano. Gli anticorpi che possono essere specifici per le versioni murine vengono identificati incubando le piastre ELISA rivestite con muTGF- $\beta$ 1 LAP C4S biotinilato. Le proteine ricombinanti che si associano con anticorpi legati sulle piastre ELISA vengono rivelate utilizzando anticorpi secondari coniugati con enzimi per la rivelazione (ad es. colorimetrica, fluorimetrica) che si legano a marcatori rivelabili presenti sulle proteine ricombinanti legate. Gli anticorpi vengono selezionati per cicli di selezione aggiuntivi o eliminati dai pool di test sulla base dei risultati ottenuti.

Gli anticorpi diretti verso proTGF- $\beta$ 1 LAP C4S sono inoltre valutati per la loro capacità di rilasciare TGF- $\beta$ 1 dai GPC. Le cellule esprimenti GPC e/o integrina  $\alpha$ v $\beta$ <sub>6</sub> vengono incubate con gli anticorpi selezionati e i surnatanti risultanti vengono usati per trattare colture di cellule comprendenti costrutti reporter rispondenti a TGF- $\beta$  per rivelare l'attività di espressione genica dipendente da fattore di crescita libero. Saggi aggiuntivi vengono effettuati per caratterizzare le regioni di riconoscimento di anticorpi legate dagli anticorpi selezionati come pure la modulazione di fattore di crescita in specifici tipi cellulari (ad es. fibroblasti e/o cellule T). Infine, stime di affinità di legame vengono fatte utilizzando esperimenti di blocco incrociato per classificare anticorpi come pure attraverso l'uso di strumenti di analisi dell'affinità, includenti, ma non limitati a strumenti della famiglia Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA). Gli anticorpi vengono inoltre selezionati in base alla loro capacità di innalzare il fattore di crescita libero rispetto al fattore di crescita latente con isoforme TGF- $\beta$  GPC alternative (ad es. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2

e/o TGF- $\beta$ 3) e TGF- $\beta$ 1 GPC da altre specie.

*Identificazione di anticorpi di stabilizzazione diretti verso il TGF- $\beta$ 1 GPC nel contesto di LTBP*

Anticorpi diretti verso proTGF- $\beta$ 1 complessato con LTBP1S vengono sottoposti a screening utilizzando ELISA per rivelare il legame a antigeni per selezione positiva e negativa. Gli anticorpi vengono valutati complessivamente per la loro capacità di associarsi con i prodomini e diminuire la segnalazione di TGF- $\beta$ . Piastre ELISA vengono rivestite con neutravidina ed incubate con pool di anticorpi biotinilati diretti verso proTGF- $\beta$ 1 complessato con LTBP1S ed incubate con proteine ricombinanti comprendenti uno o più marcatori rivelabili. Per identificare ed eliminare gli anticorpi che si legano a elementi vari (ad es. poliistidina tag, flag tag e/o siti di clivaggio per proteinasi 3C), le piastre ELISA rivestite vengono incubate con proteine ICAM-1 umane comprendenti uno o più di tali elementi vari. Per identificare ed eliminare gli anticorpi che si legano a TGF- $\beta$ 1 libero, le piastre ELISA rivestite vengono incubate con fattore di crescita TGF- $\beta$ 1 umano. Gli anticorpi che possono essere specifici per le versioni murine vengono identificati incubando piastre ELISA rivestite con muproTGF- $\beta$ 1 complessato con LTBP1S. Le proteine ricombinanti che si associano con anticorpi legati sulle piastre ELISA vengono rivelate utilizzando anticorpi secondari coniugati con enzimi per la rivelazione (ad es. colorimetrica, fluorimetrica) che si legano a marcatori rivelabili presenti sulle proteine ricombinanti legate. Gli anticorpi vengono selezionati per cicli di selezione aggiuntivi o eliminati dai pool di test in base ai risultati ottenuti.

Gli anticorpi diretti verso proTGF- $\beta$ 1 complessato con LTBP1S vengono inoltre valutati per la loro capacità di stabilizzare TGF- $\beta$ 1 GPC contro l'attivazione tramite  $\alpha$ v $\beta$ <sub>6</sub> espressa sulle cellule. Cellule esprimenti GPC e/o integrina  $\alpha$ v $\beta$ <sub>6</sub> vengono incubate con gli anticorpi selezionati e i surnatanti risultanti vengono usati per trattare colture di cellule comprendenti costrutti reporter TGF- $\beta$ -rispondenti per rivelare l'attività di espressione genica dipendente da fattore di crescita libero. Saggi aggiuntivi vengono effettuati per caratterizzare le regioni di riconoscimento di anticorpi legate dagli anticorpi selezionati come pure la modulazione di fattore di crescita in specifici tipi cellulari (ad es. fibroblasti e/o cellule T). Infine, stime dell'affinità di legame vengono fatte utilizzando esperimenti di blocco incrociato per classificare gli anticorpi come pure attraverso l'uso di strumenti di analisi di affinità, includenti, ma non limitati a strumenti della famiglia Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA).

Gli anticorpi vengono inoltre selezionati in base alla loro capacità di stabilizzare isoforme TGF- $\beta$  GPC alternative (ad es. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e/o TGF- $\beta$ 3) e TGF- $\beta$ 1 GPC da altre specie.

*Identificazione di anticorpi di rilascio diretti verso TGF- $\beta$ 1 LAP nel contesto di GARP*

Anticorpi diretti verso TGF- $\beta$ 1 LAP complessato con sGARP vengono sottoposti a screening utilizzando ELISA per rivelare legame a antigeni per selezione positiva e negativa. Gli anticorpi vengono valutati complessivamente per la loro capacità di associarsi con LAP, ma non con GARP libera e per la loro capacità di aumentare livelli e/o segnalazione di fattore di crescita TGF- $\beta$ 1 libero. Le piastre ELISA vengono rivestite con neutravidina seguito da incubazione con pool di anticorpi biotinilati diretti verso TGF- $\beta$ 1 LAP complessato con sGARP ed incubate con proteine ricombinanti comprendenti uno o più marcatori rivelabili. Per identificare ed eliminare anticorpi che si legano a elementi vari (ad es. polistidina tag, flag tag e/o siti di clivaggio per proteinasi 3C), le piastre ELISA rivestite vengono incubate con proteine ICAM-1 umane comprendenti uno o più di tali elementi vari. Per identificare ed eliminare gli anticorpi che si legano a GARP libera, le piastre ELISA rivestite vengono incubate con sGARP. Gli anticorpi che possono essere specifici per le versioni murine vengono identificati incubando piastre ELISA rivestite con muTGF- $\beta$ 1 LAP complessato con sGARP. Le proteine ricombinanti che si associano con gli anticorpi legati sulle piastre ELISA vengono rivelate utilizzando anticorpi secondari coniugati con enzimi per la rivelazione (ad es. colorimetrica, fluorimetrica) che si legano a marcatori rivelabili presenti sulle proteine ricombinanti legate. Gli anticorpi vengono selezionati per cicli di selezione aggiuntivi od eliminati dai pool di test sulla base dei risultati ottenuti.

Anticorpi diretti verso TGF- $\beta$ 1 LAP complessato con sGARP sono inoltre valutati per la loro capacità di rilasciare TGF- $\beta$ 1 dai GPC. Cellule esprimenti GPC e/o integrina  $\alpha$ v $\beta$ <sub>6</sub> vengono incubate con gli anticorpi selezionati e i supernatanti risultanti vengono usati per trattare colture di cellule comprendenti costrutti reporter TGF- $\beta$ -rispondenti per rivelare l'attività di espressione genica dipendente da fattore di crescita libero.

Gli anticorpi vengono anche testati per la capacità di attivare l'espressione genica dipendente da TGF-P specifica per cellule T. FoxP3 è un fattore di trascrizione espresso in cellule T, che è noto che è immunomodulatorio. È noto che è regolato da TGF- $\beta$  associato con GARP di superficie di cellule T. Cellule esprimenti GPC come pure GARP

vengono incubate con gli anticorpi selezionati e i surnatanti risultanti vengono utilizzati per trattare colture di cellule EL4 comprendenti costrutti reporter FoxP3.

Saggi aggiuntivi vengono effettuati per caratterizzare le regioni di riconoscimento di anticorpi legate dagli anticorpi selezionati come pure la modulazione di fattore di crescita in specifici tipi cellulari (ad es. fibroblasti e/o cellule T). Infine, stime di affinità di legame vengono fatte utilizzando esperimenti di blocco incrociato per classificare gli anticorpi come pure attraverso l'uso di strumenti di analisi di affinità, includenti, ma non limitati a strumenti della famiglia Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA). Gli anticorpi sono inoltre selezionati in base alla loro capacità di innalzare il fattore di crescita libero rispetto al fattore di crescita latente con isoforme TGF- $\beta$  GPC alternative (ad es. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e/o TGF- $\beta$ 3) e TGF- $\beta$ 1 GPC da altre specie.

*Identificazione di anticorpi di stabilizzazione diretti verso il TGF- $\beta$ 1 GPC nel contesto di GARP*

Anticorpi diretti verso proTGF- $\beta$ 1 complessato con sGARP vengono sottoposti a screening utilizzando ELISA per rivelare legame a antigeni per selezione positiva e negativa. Gli anticorpi vengono valutati complessivamente per la loro capacità di associarsi con i prodomini e diminuire la segnalazione di TGF- $\beta$ . Piastre ELISA vengono rivestite con neutravidina, seguito da incubazione con pool di anticorpi biotinilati diretti verso proTGF- $\beta$ 1 complessato con sGARP ed incubate con proteine ricombinanti comprendenti uno o più marcatori rivelabili. Per identificare ed eliminare gli anticorpi che si legano a elementi vari (ad es. poliistidina tag, flag tag e/o siti di clivaggio per proteinasi 3C), le piastre ELISA rivestite vengono incubate con proteine ICAM-1 umane comprendenti uno o più di tali elementi vari. Per identificare ed eliminare gli anticorpi che si legano a GARP libera, le piastre ELISA rivestite vengono incubate con sGARP umana. Anticorpi che possono essere specifici per le versioni murine vengono identificati incubando piastre ELISA rivestite con muproTGF- $\beta$ 1 complessato con sGARP. Le proteine ricombinanti che si associano con gli anticorpi legati sulle piastre ELISA vengono rivelate utilizzando anticorpi secondari coniugati con enzimi per rivelazione colorimetrica (ad es. perossidasi di rafano) che si legano a marcatori rivelabili presenti sulle proteine ricombinanti legate. Gli anticorpi vengono selezionati per cicli di selezione aggiuntivi o eliminati dai pool di test sulla base dei risultati ottenuti.

Anticorpi diretti verso proTGF- $\beta$ 1 complessato con sGARP sono inoltre valutati per la loro capacità di stabilizzare

TGF- $\beta$ 1 GPC. Le cellule esprimenti GPC vengono incubate con gli anticorpi selezionati e i surnatanti risultanti vengono usati per trattare colture di cellule comprendenti costrutti reporter TGF- $\beta$ -rispondenti per rivelare l'attività di espressione genica dipendente da fattore di crescita libero.

Gli anticorpi vengono anche testati per la capacità di ridurre l'espressione genica dipendente da TGF- $\beta$  specifica per cellule T. Cellule esprimenti GPC come pure GARP vengono incubate con gli anticorpi selezionati e i surnatanti risultanti vengono usati per trattare colture di cellule EL4 comprendenti costrutti reporter FoxP3. Saggi aggiuntivi vengono effettuati per caratterizzare le regioni di riconoscimento di anticorpi legate dagli anticorpi selezionati come pure la modulazione di fattore di crescita in specifici tipi cellulari (ad es. fibroblasti e/o cellule T). Infine, stime di affinità di legame vengono fatte utilizzando esperimenti di blocco incrociato per classificare gli anticorpi come pure attraverso l'uso di strumenti di analisi di affinità, includenti, ma non limitati a strumenti della famiglia Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA). Gli anticorpi sono inoltre selezionati sulla base della loro capacità di stabilizzare isoforme TGF- $\beta$  GPC alternative (ad es. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e/o TGF- $\beta$ 3) e TGF- $\beta$ 1 GPC da altre specie.

#### **Esempio 4. Progettazione di proteine chimeriche utilizzando allineamenti di sequenza**

Per la progettazione di proteine chimeriche, l'allineamento di membri della famiglia del TGF- $\beta$  è stato costruito per identificare caratteristiche strutturali conservate e il grado di conservazione di queste caratteristiche (Figura 8.) Il confronto tra sequenze della regione N-terminale rivelava livelli di conservazione superiori tra le regioni N-terminali del prodominio. Sulla base di questo allineamento delle sequenze e sulle caratteristiche strutturali di questi moduli proteici, è stata adottata una strategia di progettazione chimerica generale per membri della famiglia del TGF- $\beta$ , in modo tale da progettare chimere dove i domini BRACCIO sono scambiati (l'intero dominio BRACCIO, o sottoinsiemi del dominio BRACCIO come indicato) tra membri della famiglia.

Nello specifico, per la generazione di chimere comprendenti moduli proteici di TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e/o TGF- $\beta$ 3, l'allineamento dei tre è stato effettuato utilizzando approcci standard, e questi allineamenti di sequenza sono stati usati per creare un modello di omologia che confronta TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 alla struttura cristallina di TGF- $\beta$ 1 suino (Shi, M. et al., Latent TGF-beta structure and activation. Nature. 2011 Jun 15;474(7351):343-9.) In breve, la

sequenza di TGF- $\beta$ 2 o TGF- $\beta$ 3 è stata modellata sulla base della struttura del template e dell'allineamento di sequenze insieme con il soddisfacimento di restrizioni spaziali standard utilizzando procedure standard. Questi modelli tridimensionali sono stati analizzati per visualizzare come le combinazioni chimeriche proposte possono comprendere aree di collisione sterica. Come usato nella presente, il termine "collisione sterica" si riferisce a un'interazione tra due o più entità e/o porzioni che è perturbatrice rispetto alla forma e/o alla conformazione di ciascuna entità, ciascuna porzione o un'entità comprendente le due o più porzioni che partecipano all'interazione. Modellazione tridimensionale rivelava possibili collisioni steriche tra il loop di latenza di TGF- $\beta$ 2 ed il fattore di crescita maturo di TGF- $\beta$ 1. Nello specifico, il loop di latenza di TGF- $\beta$ 2 comprende una sequenza amminoacidica D-Y-P, le cui catene laterali possono sovrapporsi con regioni del fattore di crescita TGF- $\beta$ 1.

#### **Esempio 5. Proteina chimerica di TGF- $\beta$ 1 con loop di innesco di TGF- $\beta$ 2**

Il meccanismo di attivazione per TGF- $\beta$ 2 rimane da essere pienamente compreso. L'attivazione può essere dipendente da una o più associazioni tra il loop di innesco di TGF- $\beta$ 2 e l'integrina  $\alpha$  $\beta$ 1. Per valutare questo meccanismo di attività di TGF- $\beta$ 2, vengono sintetizzate proteine chimeriche comprendenti GPC comprendenti TGF- $\beta$ 1 in cui moduli proteici comprendenti la sequenza SGRRGDLATI (SEQ ID NO:242) vengono sostituiti con moduli proteici comprendenti loop di innesco di TGF- $\beta$ 2 comprendenti la sequenza GTSTYTSGDQKTIKSTRKK (SEQ ID NO:180) Il meccanismo di attivazione di queste proteine chimeriche (proteine chimeriche TGF- $\beta$ 1<sup>Loop di Innesco (corto)  $\beta$ 2</sup>) viene testato tramite saggio basato su cellule. Cellule (cellule HEK293 o Sw-480) vengono trasfettate con o senza integrina  $\alpha$  $\beta$ 1 oltre a GPC comprendenti TGF- $\beta$ 2, GPC comprendenti TGF- $\beta$ 1<sup>Loop di Innesco (corto)  $\beta$ 2</sup> e/o GPC comprendenti TGF- $\beta$ 2 mutante (come controlli non-attivi) in cui i loop di innesco comprendono le mutazioni Y240A, D245A e/o Q246A. Linee cellulari reporter vengono usate per rivelare il rilascio del fattore di crescita.

#### **Esempio 6. Valutazione di legame $\alpha$ 9 $\beta$ 1-TGF- $\beta$ 2 e rilascio del fattore di crescita**

Il legame tra  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 come pure il successivo rilascio del fattore di crescita non è ben compreso nella tecnica. Se si potessero delucidare i residui implicati in questa associazione, anticorpi progettati per distruggere l'associazione  $\alpha$ 9 $\beta$ 1-TGF- $\beta$ 2 possono essere sviluppati e usati per prendere di mira specificamente il rilascio del

fattore di crescita TGF- $\beta$ 2.

Costrutti mutanti come pure chimere comprendenti forme modificate di TGF- $\beta$ 2 vengono testati tramite saggio di attivazione in modo tale che possa essere mappato il sito di legame a  $\alpha$  $\beta$ <sub>1</sub> su TGF- $\beta$ 2. Ciò viene fatto generando chimere TGF- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ 2 con delezione e/o mutazione di residui amminoacidici nel o intorno al loop di innesco (in alcune forme di realizzazione, comprendenti la sequenza amminoacidica FAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTP; SEQ ID NO: 65) o con mutazioni residuo-specifiche a alanina. In alcuni casi, TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 3 può servire o può non servire come controlli negativi per legame a  $\alpha$  $\beta$ <sub>1</sub>. In alcune forme di realizzazione, proteine ricombinanti usate per la mappatura del sito di legame a  $\alpha$  $\beta$ <sub>1</sub> possono includere quelle elencate nella Tabella 18. Queste includono proTGF- $\beta$ 2-M1, proTGF- $\beta$ 2-M2, proTGF- $\beta$ 2-M3, proTGF- $\beta$ 2-M4 e proTGF- $\beta$ 2-M5 comprendenti delezioni amminoacidiche all'interno del loop di innesco. Anche inclusa è proTGF- $\beta$ 2-M6 comprendente la mutazione di due residui, Ile-Asp, in Phe-Thr. Infine, è inclusa una proteina chimerica che comprende TGF- $\beta$ 2 in cui una porzione del loop di innesco è stata sostituita con una porzione del loop di innesco da TGF- $\beta$ 1.

**Tabella 18. Proteina ricombinante per mappatura di sito di legame a  $\alpha$  $\beta$ <sub>1</sub>**

Proteina Ricombinante	Caratteristiche Fondamentali	SEQ ID NO
TGF- $\beta$ 2	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAI RQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVY KIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKA EFRVFR LQNP KARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVV KTRAEGEWLSFDVTD AVHEWLHHKDRNLGFKISLHPCCTF VPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKN SGKTPHLLMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAYCFRNVQD NCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSS DTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKI EQLSNMIVKSKCS	2
proTGF- $\beta$ 2-M1	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAI RQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVY	267

	KIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVVSAMEKNASNLVKA EFRVFRLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVV KTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHPCCTF VPSNNYIIPNKSEELARFYTSQDQKTIKSTRKKNNGKTPHLL LMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAFCFRNVQDNCCLRPLY IDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRV LSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMI VKSCCKCS	
proTGF- $\beta$ 2-M2	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVY KIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVVSAMEKNASNLVKA EFRVFRLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVV KTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHPCCTF VPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTIKSTRKKNNGKTPHLL LMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAFCFRNVQDNCCLRPLY IDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRV LSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIV KSCCKCS	268
proTGF- $\beta$ 2-M3	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVY KIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVVSAMEKNASNLVKA EFRVFRLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVV KTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHPCCTF VPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSQDQKTSKTPHLL LMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAFCFRNVQDNCCLRPLY IDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRV LSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMI VKSCCKCS	269
proTGF- $\beta$ 2-M4	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVY KIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVVSAMEKNASNLVKA EFRVFRLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVV KTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHPCCTF VPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSQDQKTIKSTRKKN PHLLLMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAFCFRNVQDNCCL RPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQ HSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQL SNMIVKSCCKCS	270
proTGF- $\beta$ 2-M5	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVY KIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVVSAMEKNASNLVKA EFRVFRLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVV KTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHPCCTF VPSNNYIIPNKSEELARFGTSTYTSQDQKTIKSTRKKNNGKT PHLLLMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAFCFRNVQDNCCL RPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQ HSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQL SNMIVKSCCKCS	271

proTGF- $\beta$ 2-M6	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVY KIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKA EFRVFRQLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVV KTRAEGEWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCCTF VPSNNYIIPNKSEELARFAGFTGTSTYTSGDQKTIKSTRKKN SGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQD NCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSS DTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKI EQLSNMIVKSKCKCS	272
proTGF- $\beta$ 2 <sup>RGD<math>\beta</math>1</sup>	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVY KIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKA EFRVFRQLQNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVV KTRAEGEWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCCTF VPSNNYIIPNKSEELARFAGIDTGRRGDLATINSKTPHLLL MLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYI DFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVL SLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIV KSKCKCS	273

Il meccanismo di attivazione di queste proteine ricombinanti viene testato tramite saggio basato su cellule. Le cellule (cellule HEK293 o Sw-480) vengono trasfettate con o senza integrina  $\alpha_9\beta_1$  oltre a GPC comprendenti TGF- $\beta$ 2, GPC comprendenti mutazioni di sostituzione di alanina per ogni residuo nel loop di innesco (in cui ogni GPC testato comprende una singola sostituzione), una delle proteine ricombinanti elencate nella Tabella 18 e/o GPC comprendenti mutanti inattivi di TGF- $\beta$ 2 (come controlli non attivi). Linee cellulari reporter vengono usate per rivelare il rilascio del fattore di crescita in campioni di terreno presi dalle cellule trasfettate. I risultati vengono usati per determinare quali residui all'interno del loop di innesco sono necessari per il rilascio del fattore di crescita TGF- $\beta$ 2 dipendente da  $\alpha_9\beta_1$ .

#### **Esempio 7. Allineamento di sequenze**

Un allineamento multiplo di sequenze di membri della famiglia del TGF- $\beta$  è stato adattato da Shi et. al. 2011 (Shi, M. et al., Latent TGF-beta structure and activation. Nature. 2011 Jun 15;474(7351):343-9). Le sequenze di TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, GDF-11, Inibina Beta A, Inibina Alfa A, BMP9, BMP2, BMP4, BMP7, BMP6, BMP8A, Lefty 1 umane, e TGF- $\beta$ 1, GDF11, GDF8 murini e TGF- $\beta$ 1, e GDF8 di scimmia cynomolgous sono state aggiunte all'allineamento utilizzando metodi standard, e le sequenze includevano le proteine a lunghezza intera (escluse le sequenze di peptide segnale) (Figura 8.)

#### **Esempio 8. Saggio di proliferazione per miostatina**

Mioblasti murini C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (ATCC, Manassas, VA) vengono coltivati in terreno essenziale modificato di Dulbecco

(DMEM; Life Technologies, Carlsbad, CA) con siero bovino fetale al 10% (FBS; Life Technologies, Carlsbad, CA) prima di eseguire il saggio. La percentuale di FBS viene variata e/o sostituita con albumina sierica bovina (BSA) a concentrazioni variabili. I saggi di proliferazione cellulare vengono condotti in piastre a 96 pozzetti non rivestite. Colture di C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> vengono seminate a 1000 cellule per pozzetto. Dopo aver permesso alle cellule di attaccarsi per 16 ore, terreno per test della miostatina viene aggiunto. Miostatina umana ricombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) viene usata per la generazione di una curva standard. Per sistemi sperimentali, il surnatante da cellule 293E sovraesprimenti la miostatina viene aggiunto, dopo trattamento con anticorpi sperimentali. Tutti i campioni vengono testati in replicati di 8. Le piastre vengono incubate per 72 ore in un'atmosfera di 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. La proliferazione viene valutata utilizzando un Luminescent Cell Viability Assay CellTiter-Glo® (Promega BioSciences, LLC, Madison, WI) per cui la lisi delle cellule genera un segnale luminescente proporzionale alla quantità di ATP presente, che è direttamente proporzionale al numero di cellule presenti in coltura (Thomas, M. et al., Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. 2000. 275(51):40235-43.)

**Esempio 9. Immobilizzazione di GPC tramite biotilazione e rivelazione di rilascio del fattore di crescita mediato da integrina**

GPC ricombinanti della presente invenzione vengono N-terminalmente biotilati ed incubati su superfici per coltura rivestite con streptavidina/avidina. Cellule esprimenti varie integrine vengono aggiunte alle superfici per coltura cellulare e coltivate per 24 ore. I terreni vengono rimossi e aggiunti a colture di cellule reporter di fattore di crescita che esprimono luciferasi in risposta all'attività del fattore di crescita. Dopo 24 ore, le cellule vengono lavate, lisate ed analizzate per l'attività della luciferasi.

**Esempio 10. Purificazione di proteine tramite Ni-NTA**

Cellule (cellule 293-6E) esprimenti proteine taggate con His vengono coltivate in terreno senza siero (FreeStyle F17 medium, Life Technologies, Carlsbad, CA) supplementato con 4 mM di glutammina, 0.1% di Pluronic F68 e 25 µg/ml di G418. Una volta che la loro vitalità scende al di sotto del 50%, il surnatante di coltura tissutale viene raccolto e chiarificato tramite centrifugazione per 10 minuti a 200 x gravità a 4°C. Il surnatante viene poi filtrato

passandolo attraverso un filtro con pori da 0.22 o 0.45  $\mu\text{m}$ . Il surnatante filtrato viene combinato con Tris, NaCl e  $\text{NiCl}_2$  per una concentrazione finale di 50 mM di Tris pH 8.0, 500 mM di NaCl e 0.5 mM di  $\text{NiCl}_2$ . 1 ml della soluzione aggiustata viene raccolto per l'analisi successiva tramite elettroforesi su gel SDS-poliacrilammide (PAGE) o tramite Western blot, mentre un'altra porzione della soluzione aggiustata viene combinata con resina Ni-NTA lavata (Life Technologies, Carlsbad, CA) ad una concentrazione di 5-10 ml di resina Ni-NTA per 300 ml della soluzione aggiustata. Questa soluzione combinata viene poi agitata a 4°C utilizzando una barra di agitazione magnetica sospesa (per prevenire macinazione di agarosio Ni-NTA.) La resina Ni-NTA viene poi raccolta tramite centrifugazione a 200 x gravità a 4°C per 10 minuti.

Poi, la colonna viene lavata con 15 volumi di colonna (CV) di tampone di lavaggio (Tris 20 mM, pH 8.0, NaCl 500 mM ed imidazolo 20 mM.) Un'aliquota dell'ultimo lavaggio viene raccolta per l'analisi. La colonna viene poi eluita con 3 CV di tampone di eluizione (Tris 20 mM, pH 8.0, NaCl 500 mM e imidazolo 300 mM) e frazioni di 1/3 di volume di colonna vengono raccolte per l'analisi.

L'assorbanza a 280 nm viene misurata in ognuna delle frazioni eluite raccolte e confrontata all'assorbanza a 280 nm di tampone di eluizione bianco. Le frazioni iniziali tipicamente hanno assorbimento negativo dovuto al gradiente di imidazolo; tuttavia, frazioni contenenti quantità più alte di proteina hanno valori positivi. Le frazioni raccolte vengono poi corse su SDS-PAGE per l'analisi e le frazioni pertinenti sono messe insieme per ulteriore purificazione.

#### **Esempio 11. Progettazione di chimere GDF-8/GDF-11/attivina**

L'allineamento basato sulla struttura di membri della famiglia del TGF- $\beta$  è stato usato per costruire modelli tridimensionali di potenziali proteine chimeriche comprendenti combinazioni di moduli da GDF-8 e GDF-11 utilizzando il software Schrodinger Bioluminate. Un modello chimerico di GDF-8 comprendente una regione braccio di GDF-11 (SEQ ID NO:216) rivelava una regione di potenziale collisione sterica implicante il residuo F95 di GDF-11. Secondo il modello, F95 dal braccio di GDF-11 causa una destabilizzazione dell'elica  $\alpha 2$  del GPC chimerico. Perciò, chimere GDF8/GDF11/Attivina sono state progettate in modo tale che la regione BRACCIO della chimera contenga l'elica  $\alpha 2$ .

### **Esempio 12. Analisi ELISA**

L'analisi di saggio immunoassorbente legato ad un enzima (ELISA) viene effettuata per valutare il legame degli anticorpi. Piastre a 96 pozzetti per saggio ELISA vengono rivestite con neutravidina, una versione deglicosilata della streptavidina con un pI più neutro. Le proteine bersaglio vengono espresse con o senza istidina (His) tag e sottoposte a biotinilazione. Le proteine bersaglio biotinilate vengono incubate con piastre per saggio ELISA rivestite con neutravidina per due ore a temperatura ambiente e le proteine non legate vengono rimosse lavando tre volte con tampone di lavaggio (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, BSA 0.1%, TWEEN®-20 0.05%). Gli anticorpi primari che vengono testati vengono aggiunti a ogni pozzetto e lasciati incubare a temperatura ambiente per 1 ora o più. L'anticorpo non legato viene poi rimosso lavando tre volte con tampone di lavaggio. Gli anticorpi secondari capaci di legarsi agli anticorpi primari che vengono testati e coniugati con marcatori rivelabili vengono poi incubati in ogni pozzetto per 30 minuti a temperatura ambiente. Gli anticorpi secondari non legati vengono rimossi lavando tre volte con tampone di lavaggio. Infine, gli anticorpi secondari legati vengono rivelati tramite reazione enzimatica, rivelazione di fluorescenza e/o rivelazione di luminescenza, a seconda del marcatore rivelabile presente sugli anticorpi secondari che vengono rivelati.

### **Esempio 13. Identificazione di anticorpi utilizzando la selezione su fago**

Programmi di screening vengono condotti per generare pannelli di anticorpi che legano gli antigeni bersaglio. La diversità del pannello di anticorpi viene misurata secondo la diversità di epitopo al contrario della diversità di sequenze di anticorpo. Vengono impiegate sia strategie di arricchimento in fagi in fase solida sia strategie di arricchimento in fase di soluzione.

Gli antigeni bersaglio (per arricchimento sia in fase solida sia in fase di soluzione) vengono sottoposti a caratterizzazione biofisica prima dell'uso, includente SDS-PAGE riducente e non-riducente per stabilire la purezza e cromatografia di esclusione dimensionale (SEC) per stabilire i livelli di aggregazione accettabili. Inoltre, saggi funzionali vengono effettuati per verificare la bioattività degli antigeni bersaglio.

2-3 cicli di arricchimento vengono effettuati con l'aspettativa che solamente tre cicli saranno necessari. Aliquote di fago da cicli di selezione 2-4 vengono preservate per un uso successivo. Dopo l'arricchimento, cloni selezionati

in modo casuale vengono sottoposti a screening tramite ELISA per esaminare il legame a antigeni mirati come pure a antigeni non mirati. Sulla base di queste analisi, fino a 500 cloni vengono selezionati per il sequenziamento nucleotidico e l'analisi del numero di anticorpi distinti come pure della frequenza di isolamento e del numero di regioni  $V_H$  e  $V_L$  distinte. Sulla base di queste successive analisi, fino a 100 cloni vengono selezionati per la classificazione degli epitopi secondo epitopo-relazionalità utilizzando la tecnologia di risonanza plasmonica di superficie (o un approccio equivalente.) le costanti di dissociazione ( $k_{off}$ ) per ognuno sono determinate e fino a 50 cloni vengono selezionati per ulteriore caratterizzazione.

I candidati finali vengono espressi come costrutti di anticorpi bivalenti, purificati e le  $k_{off}$  per ognuno vengono determinate. Saggi basati su cellule funzionali vengono usati per caratterizzare gli anticorpi bivalenti purificati.

#### **Esempio 14. Identificazione di anticorpi che bloccano l'attivazione di proGDF-8**

La produzione di un diverso pannello di anticorpi viene effettuata per identificare anticorpi che legano proGDF-8 e bloccano il rilascio di fattore di crescita maturo. La generazione di anticorpi viene effettuata secondo i metodi di Esempio 12 in cui proGDF-8 ricombinante viene usato per arricchimento in fase solida e proGDF-8 biotinilato viene usato per arricchimento in fase di soluzione. Le preparazioni di antigene vengono testate per i livelli di aggregazione per garantire che >95% sono specie dimeriche. In analisi ELISA dei cloni arricchiti, il legame a sei antigeni viene valutato (proGDF-8, GDF-8 prodominio, fattore di crescita GDF-8, proGDF-8 murino, proGDF-11 e proTGF- $\beta$ 1 C4S.) Cloni selezionati sulla base di analisi ELISA vengono sequenziati e vengono sviluppati anticorpi secondo i metodi di Esempio 12.

#### **Esempio 15. Identificazione di anticorpi che attivano il rilascio di fattore di crescita GDF-11 dal GPC latente**

La produzione di un diverso pannello di anticorpi viene effettuata per identificare anticorpi che legano il prodominio di GDF-11 e attivano il rilascio di fattore di crescita maturo. La generazione di anticorpi viene effettuata secondo i metodi di Esempio 12 in cui il prodominio di GDF-11 ricombinante viene usato per l'arricchimento in fase solida e il prodominio di GDF-11 biotinilato viene usato per l'arricchimento in fase di soluzione. Preparazioni di antigene vengono testate per livelli di aggregazione per garantire che >95% sono specie monomeriche. In analisi ELISA di cloni arricchiti, il legame a sei antigeni è valutato (prodominio di GDF-11,

proGDF-11, fattore di crescita GDF-11, prodominio di GDF-8, prodominio di GDF-11 murino e proTGF- $\beta$ 1 C4S.) Cloni selezionati sulla base di analisi ELISA vengono sequenziati e vengono sviluppati anticorpi secondo i metodi di Esempio 12.

**Esempio 16. Identificazione di anticorpi che attivano il rilascio di TGF- $\beta$ 1 dal complesso proTGF- $\beta$ 1/GARP**

La produzione di un diverso pannello di anticorpi viene effettuata per identificare anticorpi che legano TGF- $\beta$ 1 LAP che viene complessato con sGARP (TGF- $\beta$ 1 LAP-sGARP) e attivano il rilascio del fattore di crescita maturo. La generazione di anticorpi viene effettuata secondo i metodi di Esempio 12 in cui TGF- $\beta$ 1 LAP-sGARP biotinilato ricombinante viene usato per l'arricchimento in fase solida e TGF- $\beta$ 1 LAP-sGARP biotinilato viene usato per l'arricchimento in fase di soluzione. Le preparazioni di antigene vengono testate per i livelli di aggregazione per garantire che >95% delle specie comprendano TGF- $\beta$ 1 LAP dimerico complessato con sGARP monomero. In analisi ELISA dei cloni arricchiti, viene valutato il legame a otto antigeni (TGF- $\beta$ 1 LAP-sGARP, proTGF $\beta$ 1-sGARP, sGARP, TGF- $\beta$ 1 LAP C4S, proTGF- $\beta$ 1 C4S, LTBP1-proTGF $\beta$ 1, ICAM-1 N-His, ICAM-1 C-His,.) Cloni selezionati sulla base di analisi ELISA vengono sequenziati e vengono sviluppati anticorpi secondo i metodi di Esempio 12.

**Esempio 17. Identificazione di anticorpi che bloccano il rilascio di fattore di crescita maturo dal complesso proTGF- $\beta$ 1/GARP**

La produzione di un diverso pannello di anticorpi viene effettuata per identificare anticorpi che si legano al complesso formato da proTGF- $\beta$ 1 e GARP (proTGF- $\beta$ 1-GARP) e inibiscono il rilascio del fattore di crescita maturo. La generazione di anticorpi viene effettuata secondo i metodi di Esempio 12 in cui proTGF- $\beta$ 1-sGARP ricombinante biotinilato viene usato per l'arricchimento in fase solida e proTGF- $\beta$ 1-GARP biotinilato viene usato per l'arricchimento in fase di soluzione. Le preparazioni di antigene vengono testate per i livelli di aggregazione per garantire che >95% delle specie comprendano proTGF- $\beta$ 1 dimerico complessato con sGARP monomero. In analisi ELISA di cloni arricchiti, viene valutato il legame a otto antigeni (proTGF- $\beta$ 1-GARP, TGF- $\beta$ 1 LAP, proTGF- $\beta$ 1 C4S, complesso proTGF- $\beta$ 1/LTBP1S, TGF- $\beta$ 1 LAP-sGARP, sGARP, ICAM-1 C-His, ICAM-1 N-His.) Cloni selezionati sulla base di analisi ELISA vengono sequenziati e vengono sviluppati anticorpi secondo i

metodi di Esempio 12.

**Esempio 18. Identificazione di anticorpi che bloccano il rilascio di TGF- $\beta$ 1 da proTGF- $\beta$ 1 complessato con LTBP1S**

La produzione di un diverso pannello di anticorpi viene effettuata per identificare anticorpi che legano proTGF- $\beta$ 1 complessato con LTBP1S (proTGF- $\beta$ 1-LTBP1S) e inibiscono il rilascio di fattore di crescita maturo. La generazione di anticorpi viene effettuata secondo i metodi di Esempio 12 in cui pro TGF- $\beta$ 1-LTBP1S ricombinante viene usato per l'arricchimento in fase solida e pro TGF- $\beta$ 1-LTBP1S biotinilato viene usato per l'arricchimento in fase di soluzione. Le preparazioni di antigene vengono testate per i livelli di aggregazione per garantire che >95% delle specie comprendano proTGF- $\beta$ 1 dimerico complessato con LTBP1S monomeric. In analisi ELISA di cloni arricchiti, viene valutato il legame a otto antigeni (proTGF- $\beta$ 1-LTBP1S, TGF- $\beta$ 1 LAP, fattore di crescita TGF- $\beta$ 1, proTGF- $\beta$ 1 C4S, proTGF- $\beta$ 1-LTBP1S murino, LTBP1S, prodominio di GDF-8 e proTGF- $\beta$ 2.) Cloni selezionati sulla base di analisi ELISA vengono sequenziati e vengono sviluppati anticorpi secondo i metodi di Esempio 12.

**Esempio 19. Identificazione di anticorpi pan-specifici che bloccano il rilascio di TGF- $\beta$ 1 da proTGF- $\beta$ 1**

La produzione di un diverso pannello di anticorpi viene effettuata per identificare anticorpi che legano proTGF- $\beta$ 1 e inibiscono il rilascio di fattore di crescita maturo. La generazione di anticorpi viene effettuata secondo i metodi di Esempio 12 in cui proTGF- $\beta$ 1 ricombinante viene usato per l'arricchimento in fase solida e proTGF- $\beta$ 1 biotinilato viene usato per l'arricchimento in fase di soluzione. Preparazioni di antigene vengono testate per i livelli di aggregazione per garantire che >95% siano specie dimeriche. In analisi ELISA di cloni arricchiti, viene valutato il legame a sette antigeni (TGF- $\beta$ 1 LAP, fattore di crescita TGF- $\beta$ 1, proTGF- $\beta$ 1 C4S, proTGF- $\beta$ 1 C4S murino, prodominio di GDF-8 e proTGF- $\beta$ 2.) Cloni selezionati sulla base di analisi ELISA vengono sequenziati e anticorpi vengono sviluppati secondo i metodi di Esempio 12.

**Esempio 20. Identificazione di anticorpi pan-specifici che attivano il rilascio di TGF- $\beta$ 1 da proTGF- $\beta$ 1**

La produzione di un diverso pannello di anticorpi viene effettuata per identificare anticorpi che legano TGF- $\beta$ 1 LAP e attivano il rilascio di fattore di crescita maturo. La generazione di anticorpi viene effettuata secondo i metodi di Esempio 12 in cui TGF- $\beta$ 1 LAP C4S ricombinante viene usato per l'arricchimento in fase solida e TGF- $\beta$ 1 LAP

C4S biotinilato viene usato per l'arricchimento in fase di soluzione. Preparazioni di antigene vengono testate per i livelli di aggregazione per garantire che >95% siano specie dimeriche. In analisi ELISA di cloni arricchiti, viene valutato il legame a sette antigeni (TGF- $\beta$ 1 LAP C4S, proTGF- $\beta$ 1 C4S, proTGF- $\beta$ 1 C4S murino, TGF- $\beta$ 1 fattore di crescita maturo, proGDF-8 e proTGF- $\beta$ 2.) Cloni selezionati sulla base di analisi ELISA vengono sequenziati e vengono sviluppati anticorpi secondo i metodi di Esempio 12.

**Esempio 21. Immunizzazione di topi knockout per TGF- $\beta$ 1**

Topi neonati vengono immunizzati secondo i metodi di Oida et al (Oida, T. et al., TGF- $\beta$  induces surface LAP expression on Murine CD4 T cells independent of FoxP3 induction. PLOS One. 2010. 5(11):e15523.) Topi neonati deficienti per TGF- $\beta$  ricevono iniezioni di galectina-1 per prolungare la sopravvivenza (tipicamente 3-4 settimane dopo la nascita in questi topi.) Cellule produttrici stabilmente proteine antigeniche (ad es. proTGF- $\beta$ 1-GARP o TGF- $\beta$ 1 LAP-GARP;  $1-4 \times 10^6$  cellule in 10-25  $\mu$ l di PBS) o proteine antigeniche purificate vengono usate per immunizzare i topi a giorni alterni tramite iniezione intraperitoneale per 10 giorni iniziando nell'8° giorno dopo la nascita. Gli splenociti vengono raccolti nel giorno 22 dopo la nascita. Gli splenociti raccolti vengono fusi con cellule di mieloma SP 2/0. Le cellule di ibridoma risultanti vengono valutate per una produzione di successo di anticorpi anti-proTGF- $\beta$ 1.

**Esempio 22. Espressione di complessi di TGF- $\beta$ 1 e analisi delle proteine.**

L'espressione di proTGF- $\beta$ 1 è stata effettuata con o senza LTBP1S o sGARP His-taggate secondo i metodi di Esempio 10. proTGF- $\beta$ 1 espresso senza LTBP1S o sGARP comprendeva la mutazione C4S per impedire l'associazione del prodominio con questi fattori e un His tag N-terminale. Le proteine purificate sono state analizzate tramite SDS-PAGE in condizioni riducenti o non-riducenti (per mantenere dimeri o complessi di proteine). La Figura 11 rappresenta i risultati che indicano espressione di successo di queste proteine e complessi di proteine.

**Esempio 23. Espressione di antigene basata su cellule di complessi TGF- $\beta$ 1/GARP**

Sono state sviluppate linee cellulari di linfoma Pro cellule B che esprimono stabilmente ambedue GARP (membrana-legata) e proTGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 1 LAP. GARP membrana-associata è stata clonata nel vettore pYD7

(NRC Canada, Ottawa, CA) mentre proTGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 1 LAP sono stati clonati in vettori pcDNA3.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA.) Questi vettori consentono la selezione a base di blasticidina e G418, rispettivamente. Cellule derivate da linfoma a pre-Cellule b da topi BALB/c Swiss (riferiti nella presente come cellule 300.19) sono state trasfettate con vettore di controllo vuoto o GARP con co-espressione di proTGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 1 LAP e selezionate con G418 più blasticidina. Le cellule resistenti sono state sottoclonate e singole colonie sono state selezionate. Cellule coltivate dalle linee cellulari risultanti sono state sondate con anticorpi (coniugati con particelle fluorescenti) diretti verso le proteine espresse ed esaminate tramite citometria a flusso per l'intensità di fluorescenza. La Figura 12 presenta dati di intensità di fluorescenza raccolti dalle cellule risultanti. I valori basali associati con cellule trasfettate con vettore di controllo vuoto sono mostrati nella Figura 12A, mentre le intensità di fluorescenza elevate nelle Figure 12B e 12C indicano espressione in superficie cellulare di complessi di GARP. Una quantificazione delle proteine espresse in superficie è stata effettuata attraverso analisi aggiuntive in cui le stesse cellule fluorescentemente marcate usate per generare i dati rappresentati nella Figura 12, sono state esaminate tramite citometria a flusso accanto a beads con definita capacità di legame a anticorpi per la generazione di una curva standard. Queste beads sono state marcate con gli stessi anticorpi usati per marcare le cellule e i valori di fluorescenza ottenuti sono stati usati per estrapolare il numero di anticorpi legati alle proteine espresse in superficie. È stato determinato che cellule 300.19 esprimenti proTGF- $\beta$ 1-GARP esprimono circa 83000 copie/cellula, mentre è stato determinato che cellule 300.19 esprimenti TGF- $\beta$ 1 LAP-GARP esprimono circa 66000 copie/cellula.

Le linee cellulari sono state poi testate per l'attività di TGF- $\beta$ 1 in presenza di cellule esprimenti integrine  $\alpha\beta_6$ , note rilasciare fattore di crescita TGF- $\beta$ 1 da GPC latenti. È stato utilizzato terreno condizionato da queste co-culture per trattare cellule reporter comprendenti recettori per TGF- $\beta$  come pure il gene della luciferasi, guidato da un promotore TGF- $\beta$ -rispondente, PAI-1. Questo è stato fatto in presenza o in assenza di un anticorpo neutralizzante, anti-TGF- $\beta$ , clone 1D11. L'attività della luciferasi risultante è stata valutata tramite luminometria. I risultati indicano che il terreno condizionato da cellule esprimenti vettori vuoti e complessi TGF- $\beta$ 1 LAP-GARP è stato incapace di indurre espressione della luciferasi rispetto a valori basali, mentre terreno condizionato da

cellule esprimenti proTGF- $\beta$ 1-GARP mostrava una capacità accresciuta di indurre l'espressione della luciferasi (si veda la Figura 12D.)

**Esempio 24. Espressione di antigene basata su cellule di proTGF- $\beta$ 1-LTBP1**

Vengono sviluppati fibroblasti murini NIH 3T3 che esprimono stabilmente proTGF- $\beta$ 1-LTBP1. Queste proteine secrete si legano alla superficie cellulare o sono depositate nella matrice extracellulare.

**Esempio 25. Espressione di LTBP3**

Proteine LTBP3 ricombinanti vengono espresse con o senza vari moduli, frammenti, sequenze segnale di secrezione N-terminali (ad es. SEQ ID NO: 257) e/o istidina tag N- o C-terminali. Moduli inclusi in alcune proteine espresse includono quelli elencati nella Tabella 19.

**Tabella 19. Moduli di LTBP3**

<b>Proteina</b>	<b>Sequenza</b>	<b>SEQ ID NO</b>
LTBP3 dominio EGF-simile, modulo 1	DIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLL ECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQ RQCLSP	274
LTBP3 dominio EGF-simile, modulo 2	DVDECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDC QLP	275
LTBP3 dominio EGF-simile, modulo 3	DIDECSDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQH GCE	276
LTBP3 dominio EGF-simile, modulo 4	DIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLL ECV	277

dominio TB, modulo 1	KKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCSLGAGWGDHC EIYPCPVYSSAEFHSLCP	278
dominio TB, modulo 2	DVCWSQRGEDGMCAGPLAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQ CRPCPPRGAGSHCP	279

I frammenti di LTBP3 inclusi in alcune proteine espresse includono quelli elencati nella Tabella 20.

**Tabella 20. Frammenti di LTBP3**

<b>Proteina</b>	<b>Sequenza</b>	<b>SEQ ID NO</b>
L3-TB3TB4 isoforma 1	KKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCSLGAGWGDHC EIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDE CMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVD VDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACPPAEYSPAQRQCL SPEEMDVDECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGP SGRDCQLPESPAERAPERRDVCWSQRGEDGMCAGPLAGP ALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCPPRGAGSHCPTSQSE	280
L3-TB3TB4 isoforma 2	KKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCSLGAGWGDHC EIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDE CMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVD VDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACPPAEYSPAQRQCL SPEEMERAPERRDVCWSQRGEDGMCAGPLAGPALTFDDC CCRQGRGWGAQCRPCPPRGAGSHCPTSQSE	281
L3-ETB3E, tipo 1	DIDECSQDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVDEGFTPTQDQH GCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCS LGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVN YGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGF YDGNLLECVDVDE	282
L3-ETB3E, tipo 2	QDIDECSQDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVDEGFTPTQDQ HGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECC SLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIV NYGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGF YYDGNLLECVDVDE	283

L3-ETB3E, tipo 3	DIDECSQDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQH GCEEVEQPHHKKECYLNFD DTVFCDSVLATNVTQQECCCS LGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVN YGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFY YDGNLLECV	284
L3-ETB3E, tipo 4	QDIDECSQDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQ HGCEEVEQPHHKKECYLNFD DTVFCDSVLATNVTQQECCC SLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIV NYGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGF YYDGNLLECV	285

Ulteriori proteine espresse includono quelle elencate nella Tabella 21.

**Tabella 21. Proteine ricombinanti LTBP3**

Proteina	Sequenza	SEQ ID NO
L3-TB3TB4 isoforma 1	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGLGKKECYLNFD DTVFCDSV LATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCP DGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNT QPGYECYCKQGFYDGNLLECV DVDECLDESNCRNGVCE NTRGGYRCACPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVDECQDPAAC RPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPE RRDVCWSQRGEDGMCAGPLAGPALTFDDCCCRQGRGWG AQCRPCPPRGAGSHCPTSQSEHHHHHH	286
L3-TB3TB4 isoforma 2	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGLGKKECYLNFD DTVFCDSV LATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCP DGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNT QPGYECYCKQGFYDGNLLECV DVDECLDESNCRNGVCE NTRGGYRCACPPAEYSPAQRQCLSPEEMERAPER RDVCW SQRGEDGMCAGPLAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCP PRGAGSHCPTSQSEHHHHHH	287
L3-ETB3E, tipo 1C	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGLGDIDECSQDPSLCLPHGAC KNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLN DDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYS SAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGSEI CKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYDGNLLECV DVDEHHHH HH	288
His-L3- ETB3E, tipo 1N	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGLGHHHHHHSSGDIDECSQD PSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQP HHKKECYLNFD DTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGD HCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDI DECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYDGNLLECV VDVDE	289

His-L3-ETB3E, tipo 2	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGHHHHHSSGQDIDECSSQ DPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQ PHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCSLGAGWG DHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHR DIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLL ECVDVDE	290
His-L3-ETB3E, tipo 3	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGHHHHHSSGDIDECSSQD PSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQP HHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCSLGAGWGD HCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDI DECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLEC V	291
His-L3-ETB3E, tipo 4	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGHHHHHSSGQDIDECSSQ DPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQ PHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCSLGAGWG DHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHR DIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLL ECV	292

#### **Esempio 26. Saggio CAGA-luciferasi su 293T per attività di GDF-8**

Saggi CAGA-luciferasi vengono effettuati per testare anticorpi che modulano l'attività di GDF-8. Una soluzione 50 µg/ml di fibronectina viene preparata e 100 µl vengono aggiunti a ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti. Le piastre vengono incubate per 30 min a temperatura ambiente prima che la fibronectina libera sia lavata via utilizzando PBS. Cellule 293T comprendenti espressione transiente o stabile di pGL4 (Promega, Madison, WI) sotto il controllo di un promotore di controllo o un promotore comprendente sequenze smad1/2 rispondenti a CAGA vengono poi usate per seminare pozzetti rivestiti con fibronectina (2 x 10<sup>4</sup> cellule/pozzetto in terreno di crescita completo.) Il giorno successivo, le cellule vengono lavate con 150 µl/pozzetto di terreno per coltura cellulare con 0.1% di albumina sierica bovina (BSA) prima di trattamento con GDF-8 con o senza anticorpo del test. Le cellule vengono incubate a 37° per 6 ore prima della rivelazione dell'espressione della luciferasi utilizzando reagente BRIGHT-GLO™ (Promega, Madison, WI) secondo le istruzioni del produttore.

#### **Esempio 27. Rivelazione di espressione di miogenina tramite FACS**

Cellule 257384 Lonza (Lonza, Basel, Switzerland) vengono piastrate in piastre a 24 pozzetti a 4 x 10<sup>4</sup> cellule/pozzetto. Il giorno successivo, il terreno per cellule viene sostituito con terreno di differenziazione

[Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 con 2% di siero equino.] Concentrazioni variabili di GDF-8 vengono anche incluse nel terreno di differenziazione in presenza o in assenza di anticorpi da testare. Le cellule vengono poi lasciate differenziare per 3 giorni.

Dopo il periodo di 3 giorni, lo stato di differenziazione di ogni pozzetto viene analizzato attraverso analisi dei livelli di espressione di miogenina. Cellule da ogni gruppo di trattamento vengono unite in pool e sottoposte a trattamento utilizzando il Transcription Factor Buffer Set da BD Pharmingen (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey), numero prodotto 562574 secondo le istruzioni dei produttori. Dopo fissazione e permeabilizzazione, 5  $\mu$ l di ficoeritrina (PE)-miogenina o 1.25  $\mu$ l di PE-controllo vengono aggiunti alle cellule ed incubati a 4°C per 50 min. Le cellule vengono poi lavate e risospese in tampone FACS prima dell'analisi di fluorescenza cellulare tramite FACS.

#### **Esempio 28. Saggio di proliferazione di cellule HT2**

Gli anticorpi vengono testati per la capacità di modulare attività di TGF- $\beta$  utilizzando un saggio di proliferazione di cellule HT2. La proliferazione di cellule HT2 in terreno contenente IL-4 viene ridotta in presenza di fattore di crescita TGF- $\beta$  libero. Anticorpi con la capacità di modulare livelli di fattore di crescita libero stabilizzando TGF- $\beta$  GPC o promuovendo il rilascio e/o l'accumulo di fattore di crescita libero possono essere testati utilizzando il sistema di coltura HT2 descritto qui. Cellule esprimenti proTGF- $\beta$  vengono co-coltivate con cellule esprimenti integrine  $\alpha v \beta_6$ . Le colture vengono trattate con varie concentrazioni di anticorpo da testare, TGF- $\beta$ 1 purificato (come un controllo positivo) o anticorpo anti-TGF- $\beta$  1D11 (R&D Systems, Minneapolis, MN) come un controllo negativo.

Cellule HT2 vengono coltivate in terreni di crescita (RPMI 1640, 10% di FBS, 1% di P/S, 4mM di Gln, 50 $\mu$ M di beta-mercaptoetanolo e 10 ng/mL di IL-2) a  $1.5 \times 10^5$  cellule/ml per garantire che le cellule siano in fase di crescita logaritmica nel giorno seguente. Il giorno successivo, i surnatanti cellulari che vengono testati vengono diluiti in terreno per saggio di HT2 (RPMI 1640, 10% di FBS, 1% di P/S, 4mM di Gln, 50 $\mu$ M di beta-mercaptoetanolo e 7.5 ng/mL di IL-4.) Il terreno di crescita viene rimosso da colture di cellule HT2 e le cellule vengono lavate con terreno privo di citochine. Surnatanti diluiti vengono aggiunti a ogni pozzetto di coltura di cellule HT2 e le cellule

HT2 vengono coltivate per 48 ore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. La vitalità cellulare nelle colture di cellule HT2 viene poi determinata utilizzando reagente CELL-TITLE GLO® (Promega, Madison, WI) secondo le istruzioni dei produttori. I risultati vengono ottenuti come unità di luce relativa (RLU) che sono in correlazione con la vitalità cellulare.

### **Esempio 29. Analisi di GDF-8 espresso per via ricombinante**

proGDF-8 taggato con istidina è stato espresso secondo i metodi di Esempio 10. Le proteine purificate sono state analizzate tramite SDS-PAGE in condizioni riducenti o non-riducenti (che mantengono dimeri di proteine). La Figura 13 rappresenta i risultati che indicano l'espressione di successo di queste proteine e complessi di proteine.

### **Esempio 30. Chimere di TGF-β2**

Vengono sintetizzate proteine chimeriche che comprendono TGF-β2 con sostituzioni nella regione braccio da TGF-β1 e TGF-β3. Le proteine chimeriche comprendono anche mutazioni C5S N-terminali. Queste proteine chimeriche espresse (elencate nella Tabella 22) hanno stabilità migliorata rispetto a alcune altre proteine chimeriche.

**Tabella 22. Proteine chimeriche di TGF-β2.**

<b>Modulo Proteico 1</b>	<b>Modulo Proteico 2</b>	<b>Sequenza Chimerica</b>	<b>SEQ ID NO</b>
TGF-β2 LAP	regione braccio TGF-β1	SLSTSSTLDMQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPE DYPEPEEVPPEVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPE ADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMF FNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVKVEQHVE LYQKYSNNSWRVLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGV VRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDIN GFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHL QSSRHRR	293
TGF-β2 LAP	regione braccio TGF-β3	SLSTSSTLDMQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPE DYPEPEEVPPEVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCT QENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGI TSKVFRFNVSSVEKNRNTLFRAEFRVLRVNPSSK RNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAE WLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQ PNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGRKKR	294

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo capace di legare un antigene ricombinante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1 o un complesso fattore di crescita-prodominio (GPC) che comprende SEQ ID NO: 38; in cui detto anticorpo modula il rilascio di TGF- $\beta$ 1 da un GPC; in cui facoltativamente detto antigene ricombinante è un complesso proteico comprendente:
  - i. una proteina selezionata dal gruppo costituito da proteina legante il TGF- $\beta$  latente 1S (LTBP1S), ripetizioni predominanti della glicoproteina A (GARP), LTBP1, LTBP2, LTBP3, LTBP4, fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3, fibrillina-4, contenente ripetizioni ricche in leucina (LRRC33), perlecano, decorina, elastina e collagene, e/o
  - ii. una proteina comprendente una o più sequenze amminoacidiche selezionate dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 156, 159, 143-155, 157, 158, 160, 161, 286-294 e una combinazione o un frammento delle stesse.
2. Anticorpo secondo la rivendicazione 1, in cui detto anticorpo è un anticorpo di stabilizzazione che riduce o impedisce il rilascio del fattore di crescita dai GPC e/o il rilascio di GPC da una o più interazioni proteiche.
3. Anticorpo secondo la rivendicazione 1, in cui detto anticorpo è un anticorpo di rilascio che accresce il rilascio del fattore di crescita dai GPC e/o il rilascio di GPC da una o più interazioni proteiche.
4. Anticorpo secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui detto anticorpo è un anticorpo monoclonale, in cui facoltativamente l'anticorpo è umano o umanizzato.
5. Anticorpo secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 4, che si lega al lazo di latenza del TGF- $\beta$ 1, come mostrato in SEQ ID NO: 58.
6. Anticorpo secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 5 per uso in un metodo di modulazione di attività di un fattore di crescita in un sistema biologico comprendente mettere a contatto detto sistema biologico con l'anticorpo.
7. Anticorpo secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 6 che lega selettivamente uno o più epitopi combinatori tra GARP e proTGF- $\beta$ 1.
8. Anticorpo secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 6 che lega un epitopo dipendente da

conformazione sul GPC, facoltativamente in cui l'anticorpo attiva o inibisce selettivamente l'attività del fattore di crescita TGF- $\beta$ 1 a seconda dell'identità della proteina legata.

9. Composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 8 e almeno un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

10. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9 per uso in un metodo di trattamento di una indicazione correlata a TGF- $\beta$  in un soggetto comprendente mettere a contatto detto soggetto con detta composizione,

in cui facoltativamente detta indicazione correlata a TGF- $\beta$  comprende

(a) una indicazione fibrotica selezionata dal gruppo costituito da fibrosi polmonare, fibrosi renale, fibrosi epatica, fibrosi cardiovascolare, fibrosi cutanea, e fibrosi del midollo osseo; o

(b) mielofibrosi; o

(c) uno o più tipi di cancro o condizioni correlate a un cancro, quali linfomi/leucemie, carcinomi e sarcomi, e cancri o tumori trovati nell'ano, nella vescica, nel dotto biliare, nell'osso, nel cervello, nella mammella, nella cervice, nel colon/retto, nell'endometrio, nell'esofago, nell'occhio, nella cistifellea, nella testa e nel collo, nel fegato, nel rene, nella laringe, nel polmone, nel mediastino, nella bocca, nelle ovaie, nel pancreas, nel pene, nella prostata, nella pelle, nell'intestino tenue, nello stomaco, nel midollo spinale, nel coccige, nei testicoli, nella tiroide e nell'utero;

in cui detti uno o più tipi di cancro o condizioni correlate a un cancro sono inoltre facoltativamente selezionati dal gruppo costituito da cancro del colon, cancro del rene, cancro della mammella, melanoma maligno e glioblastoma;

o

(d) uno o più disordini e/o danni muscolari;

in cui inoltre facoltativamente detti uno o più disordini e/o danni muscolari sono selezionati dal gruppo costituito da cachessia, distrofia muscolare, malattia polmonare ostruttiva cronica (BPCO), malattia del motoneurone, trauma, malattia neurodegenerativa, infezione, artrite reumatoide, immobilizzazione, atrofia da disuso, sarcopenia, miosite da corpi di inclusione e diabete; o

(e) uno o più disordini immuni e/o autoimmuni.

11. Kit comprendente la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9 e istruzioni per l'uso della stessa.

12. Metodo di generazione di un anticorpo come definito in una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui l'anticorpo viene preparato utilizzando un antigene ricombinante comprendente SEQ ID NO: 1 o un suo frammento, o un antigene ricombinante comprendente un complesso fattore di crescita-prodominio (GPC) che comprende SEQ ID NO: 38.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detto antigene ricombinante comprende o è complessato con:

- i. una proteina selezionata dal gruppo costituito da proteina legante il TGF- $\beta$  latente (LTBP1S), ripetizioni predominanti della glicoproteina A (GARP), LTBP1, LTBP2, LTBP3, LTBP4, fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3, fibrillina-4, contenente ripetizioni ricche in leucina (LRRC33), perlecano, decorina, elastina e collagene, e/o
- ii. una proteina comprendente una o più sequenze amminoacidiche selezionate dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 156, 159, 143-155, 157, 158, 160, 161, 286-294 e una combinazione o un frammento delle stesse.

14. Metodo di generazione di un anticorpo che modula il rilascio di TGF- $\beta$ 1 da un complesso fattore di crescita-prodominio (GPC) comprendente i passi di:

- a) selezionare un anticorpo da un pool di due o più anticorpi candidati in base alla capacità di associarsi con un antigene, in cui l'antigene comprende un GPC, che comprende un prodominio di TGF- $\beta$ 1 e un fattore di crescita TGF- $\beta$ 1; e
- b) selezionare un anticorpo dal pool di due o più anticorpi candidati in base alla capacità di modulare livelli e/o attività del fattore di crescita TGF- $\beta$ 1.

15. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui l'antigene di passo (a) comprende inoltre:

- i. una proteina selezionata dal gruppo costituito da LTBP1S, GARP, LTBP1, LTBP2, LTBP3, LTBP4, fibrillina-1, fibrillina-2, fibrillina-3, fibrillina-4, contenente ripetizioni ricche in leucina (LRRC33), perlecano, decorina, elastina e collagene, e/o

- ii. una proteina comprendente una o più sequenze amminoacidiche selezionate dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 156, 159, 143-155, 157, 158, 160, 161, 286-294 e una combinazione o un frammento delle stesse.
- 16. Metodo secondo la rivendicazione 14 o la rivendicazione 15, in cui il passo (b) comprende usare un saggio di rilascio del fattore di crescita basato su cellule per selezionare un anticorpo per la capacità di modulare il rilascio del fattore di crescita dal GPC.
- 17. Metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni da 14 a 16, in cui l'anticorpo selezionato è un anticorpo di stabilizzazione che riduce o impedisce il rilascio del fattore di crescita dai GPC.
- 18. Metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni da 15 a 16, in cui l'anticorpo selezionato è un anticorpo di rilascio che accresce il rilascio del fattore di crescita dai GPC.
- 19. Metodo secondo la rivendicazione 12 o la rivendicazione 13, o il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni da 14 a 18, in cui l'anticorpo viene preparato tramite un metodo secondo la rivendicazione 12 o la rivendicazione 13, comprendente immunizzare un ospite con l'antigene ricombinante, in cui facoltativamente l'antigene ricombinante è un antigene basato su cellule.
- 20. Metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni da 12 a 19, in cui l'anticorpo viene preparato utilizzando cellule di ibridoma.
- 21. Metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni da 12 a 20, in cui l'anticorpo viene preparato utilizzando tecniche di screening di librerie di esposizione ad alto rendimento, facoltativamente utilizzando la tecnologia dell'esposizione su fago.

Figure 1

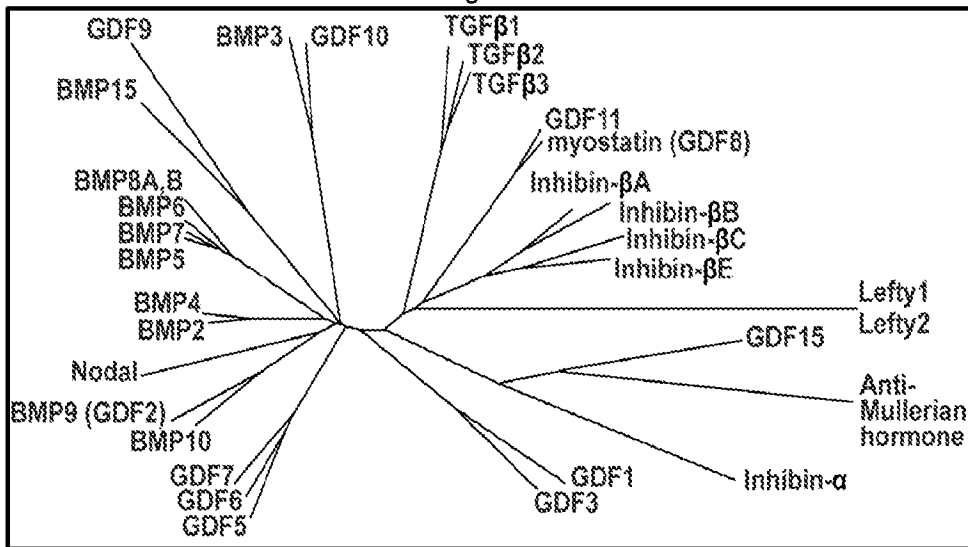


Figure 2

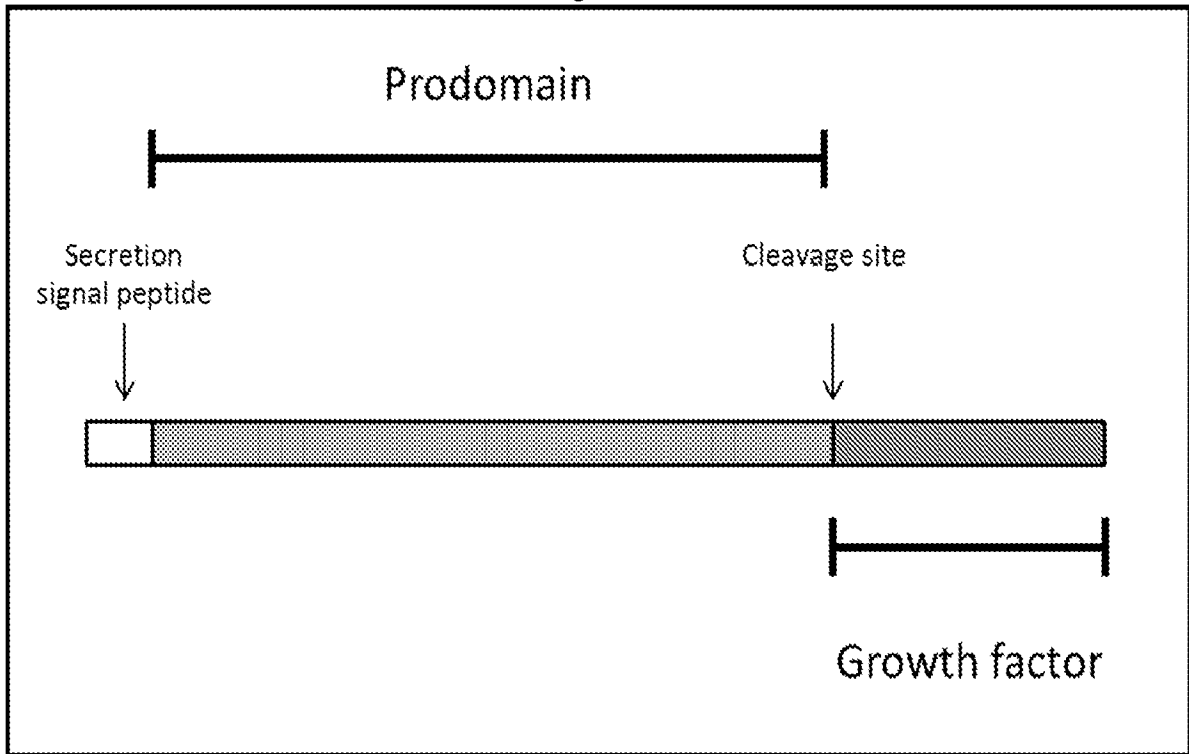


Figure 3

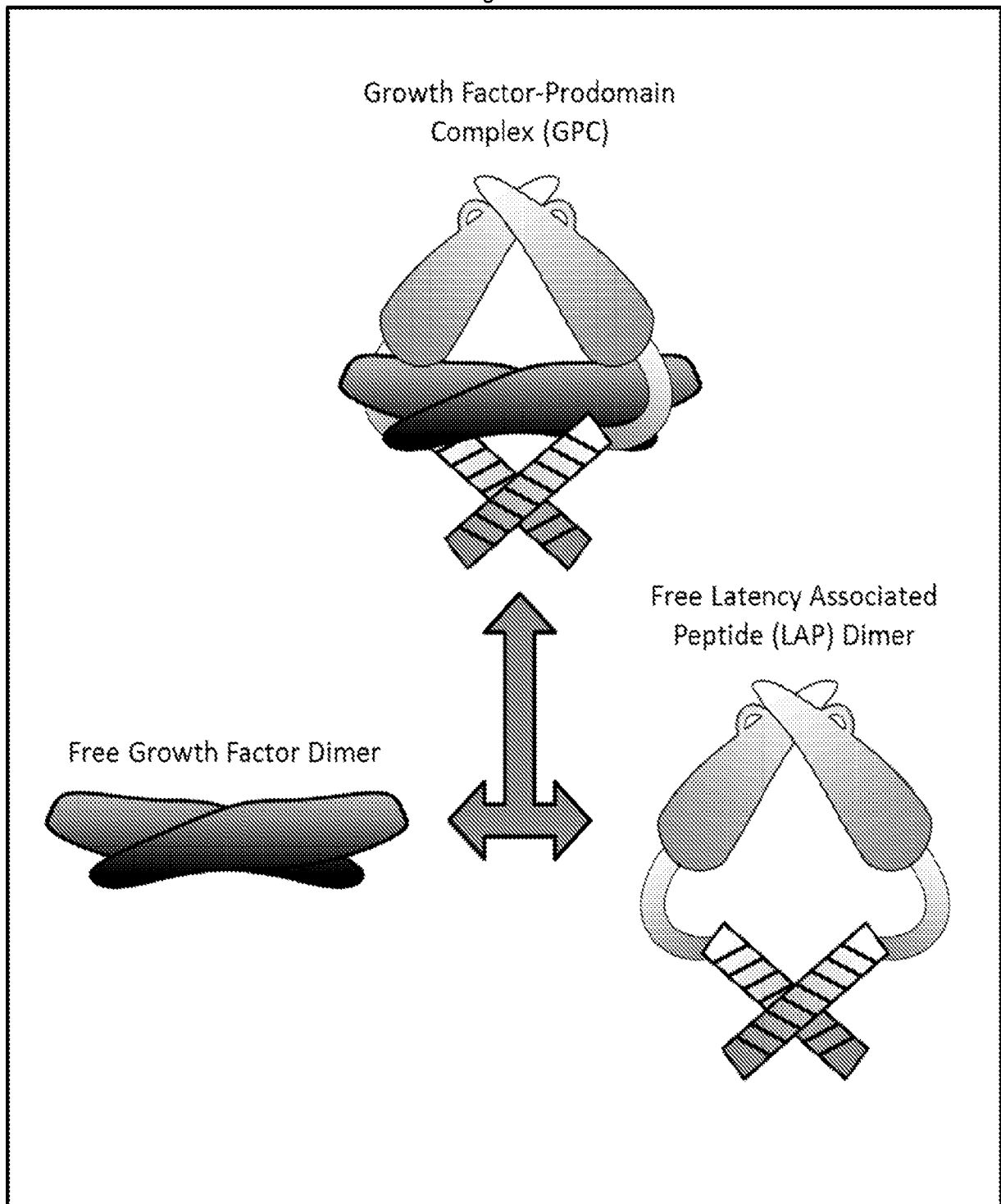


Figure 4

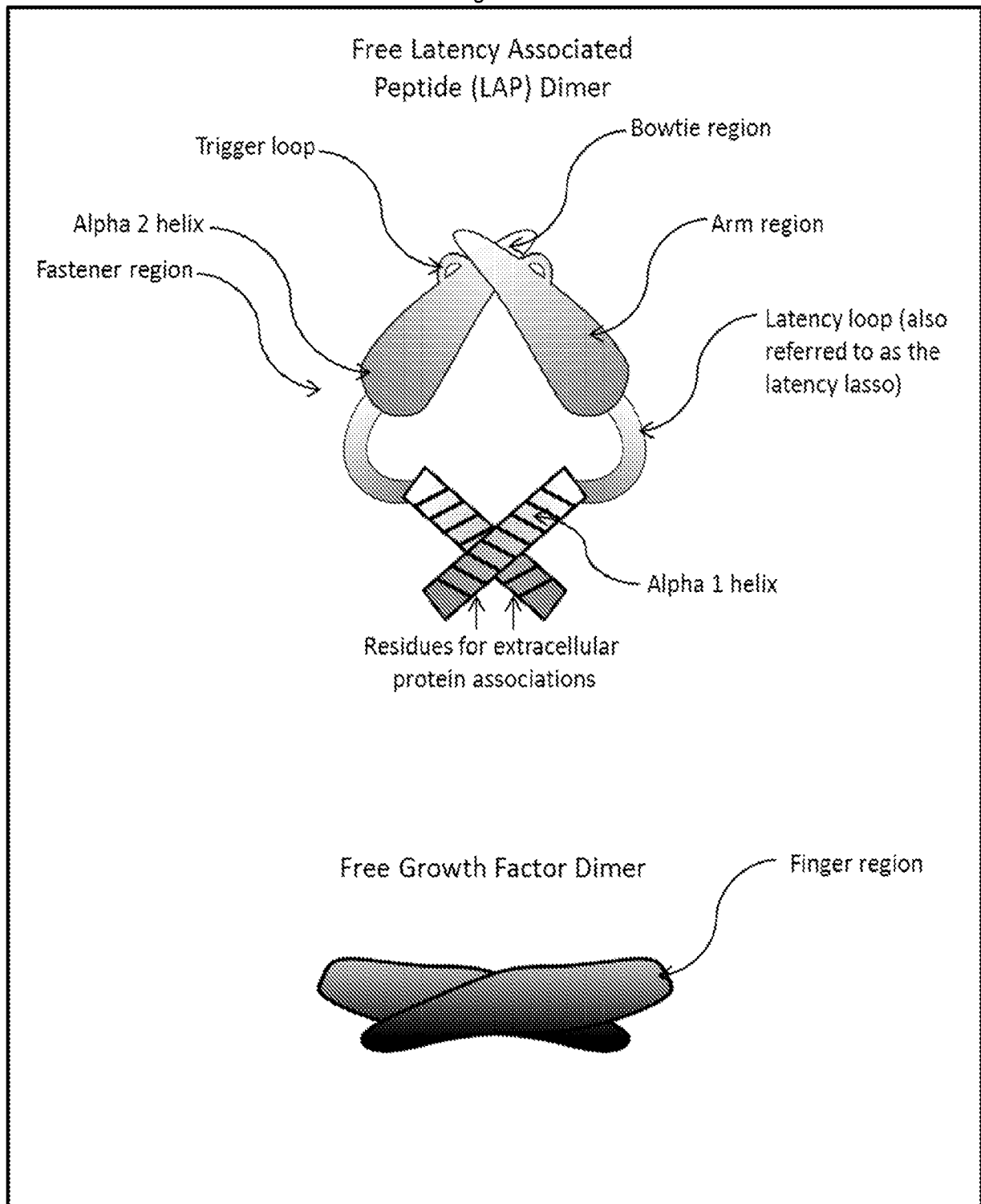


Figure 5

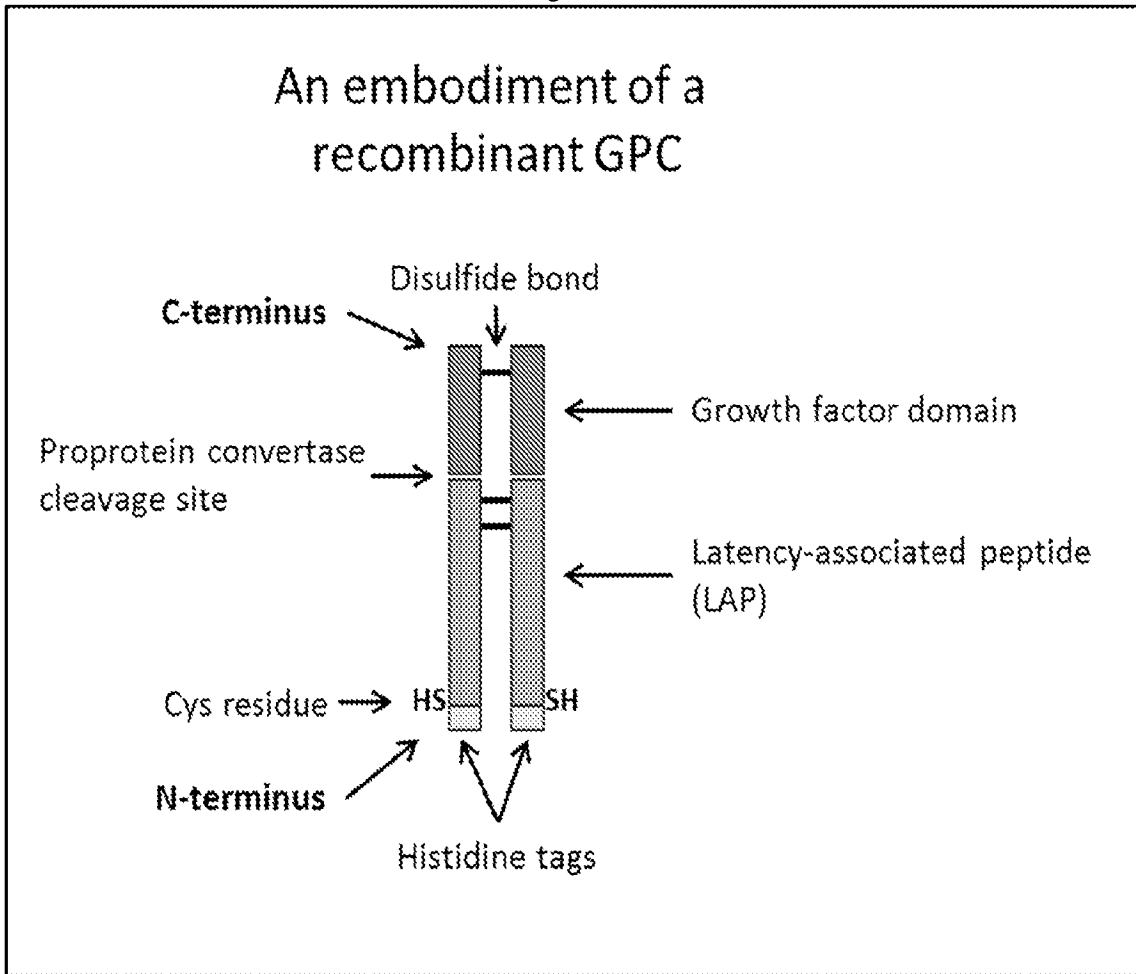
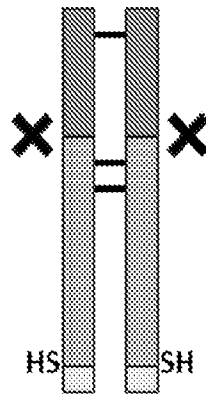


Figure 6

An embodiment of a proprotein convertase cleavage site mutant (e.g. RXXR  $\rightarrow$  RXG; D2G)



An embodiment of an N-terminal cysteine mutant (e.g. C4S: Cys4  $\rightarrow$  Ser)

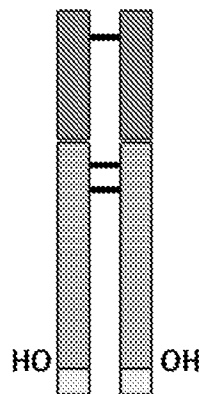
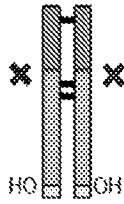
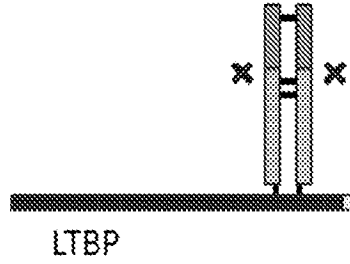


Figure 7

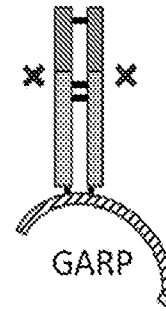
## Embodiments of recombinant proteins



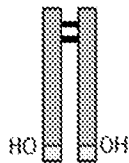
proTGF- $\beta$  proprotein  
convertase cleavage  
site mutant with N-  
terminal cysteine  
mutation



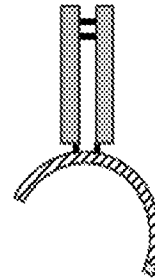
proTGF- $\beta$  proprotein  
convertase cleavage  
site mutant complexed  
with LTBP



proTGF- $\beta$  proprotein  
convertase cleavage  
site mutant complexed  
with GARP



TGF- $\beta$  LAP with N-  
terminal cysteine  
mutation



TGF- $\beta$  LAP complexed  
with GARP

FIGURE 8A

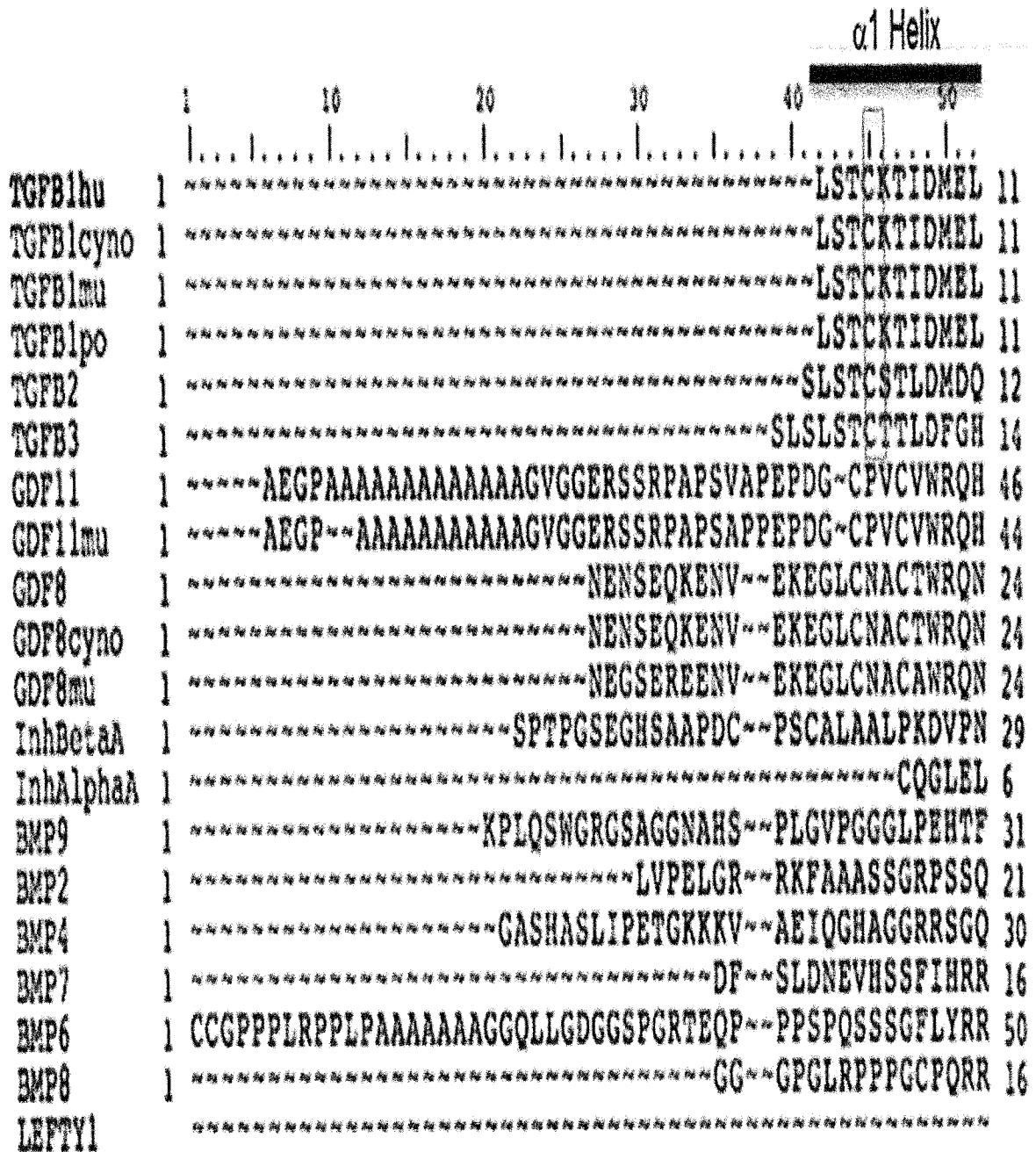


FIGURE 8A (CONTINUED)

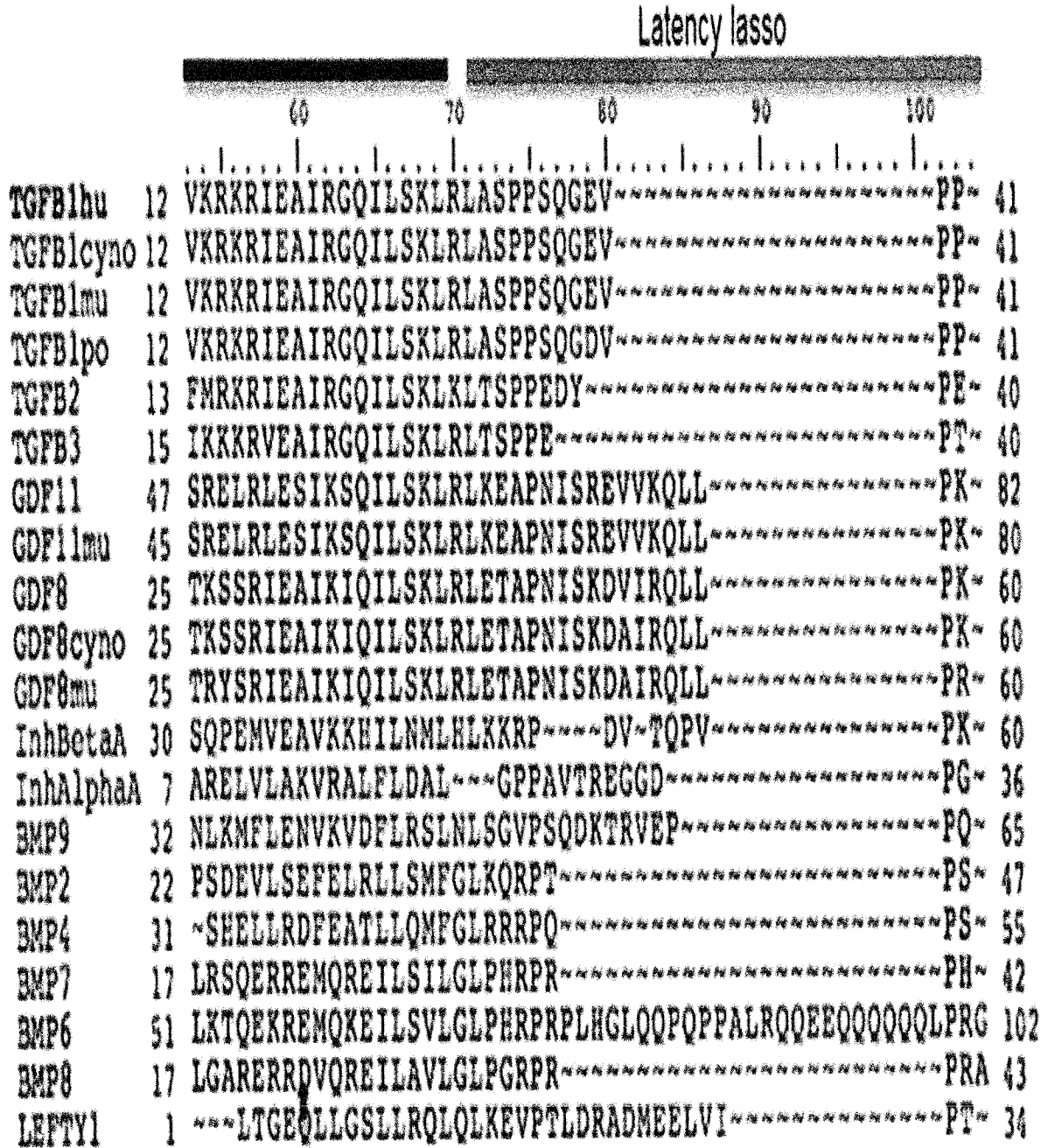


FIGURE 8A (CONTINUED)

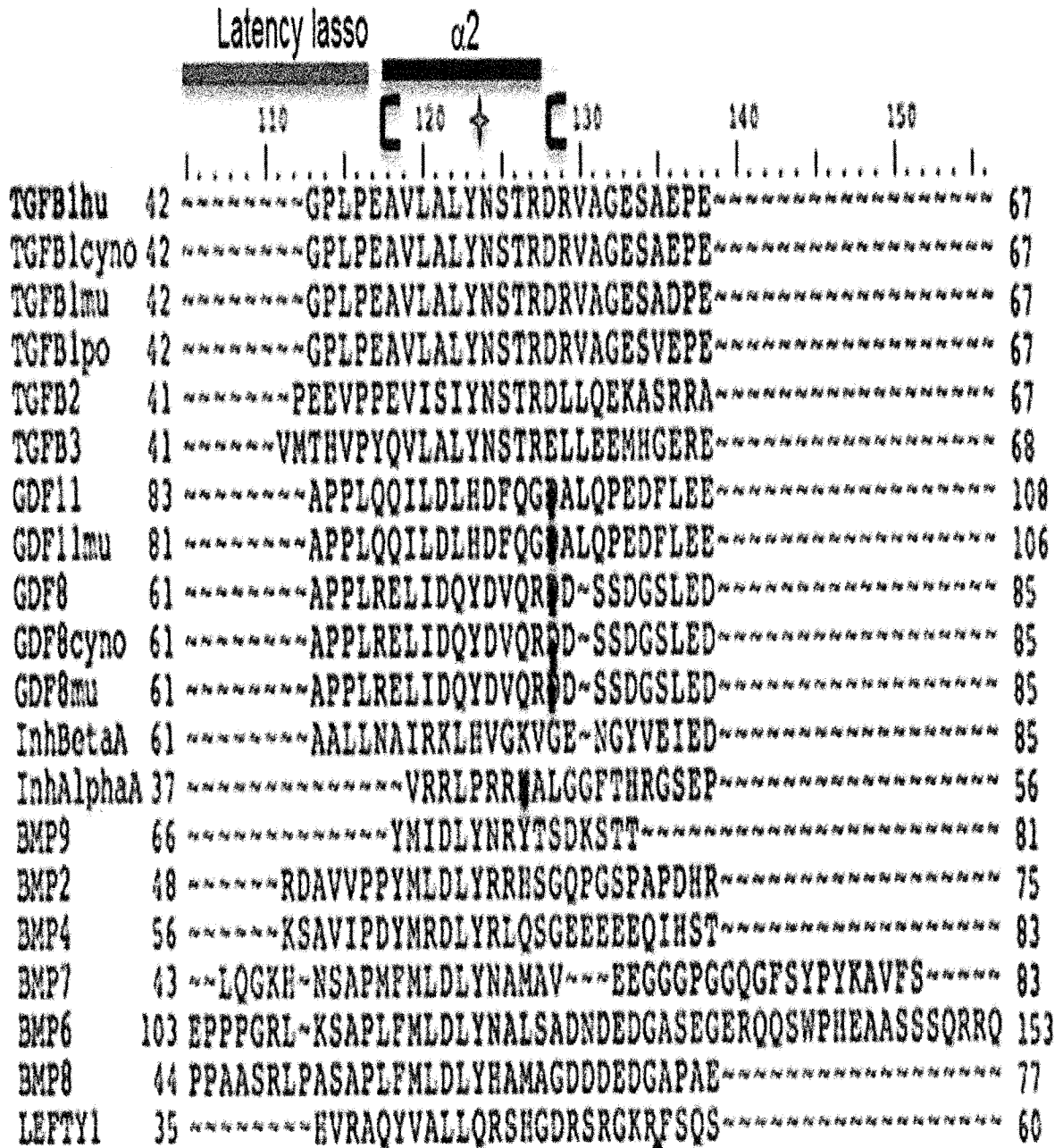


FIGURE 8A (CONTINUED)

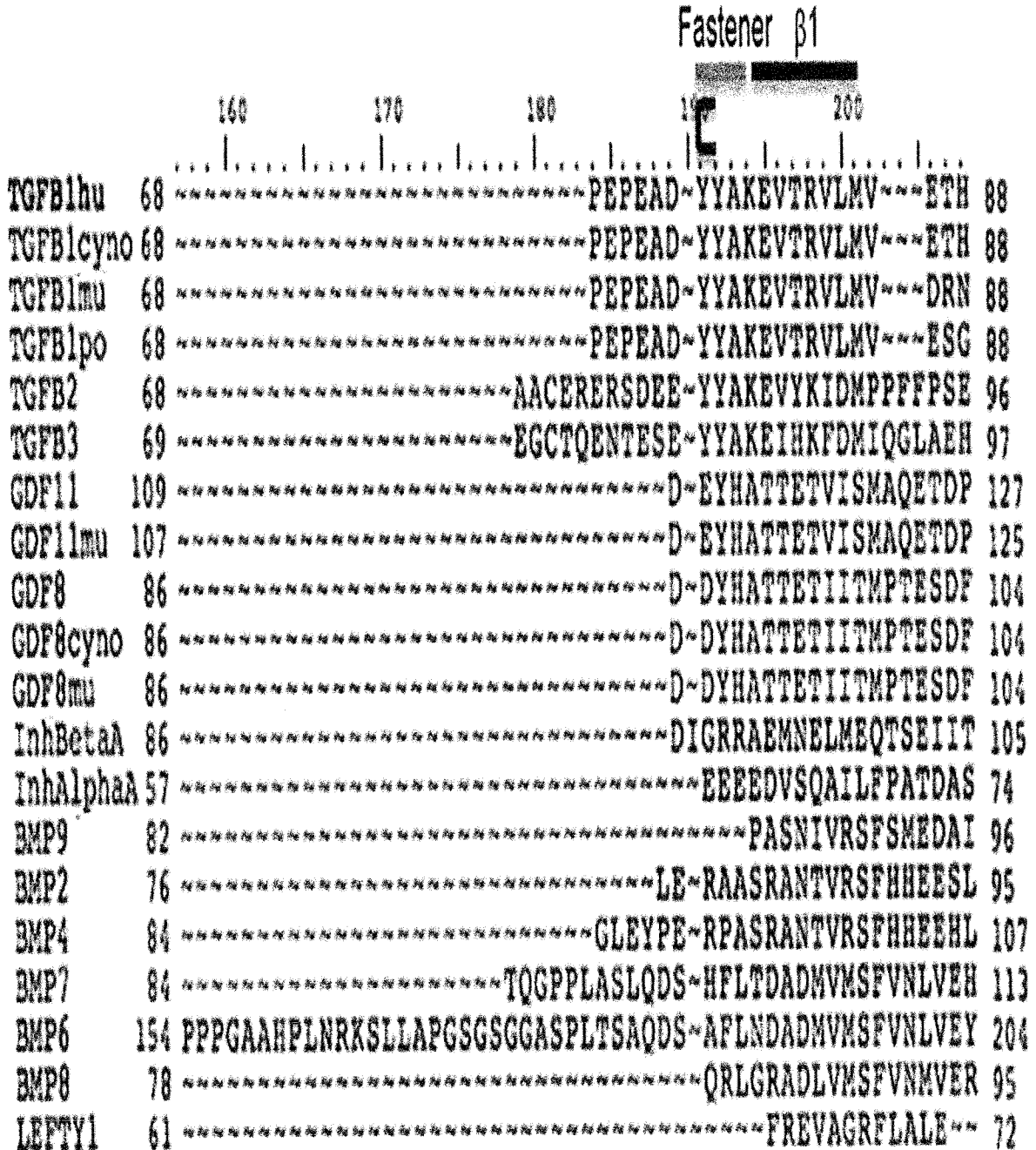
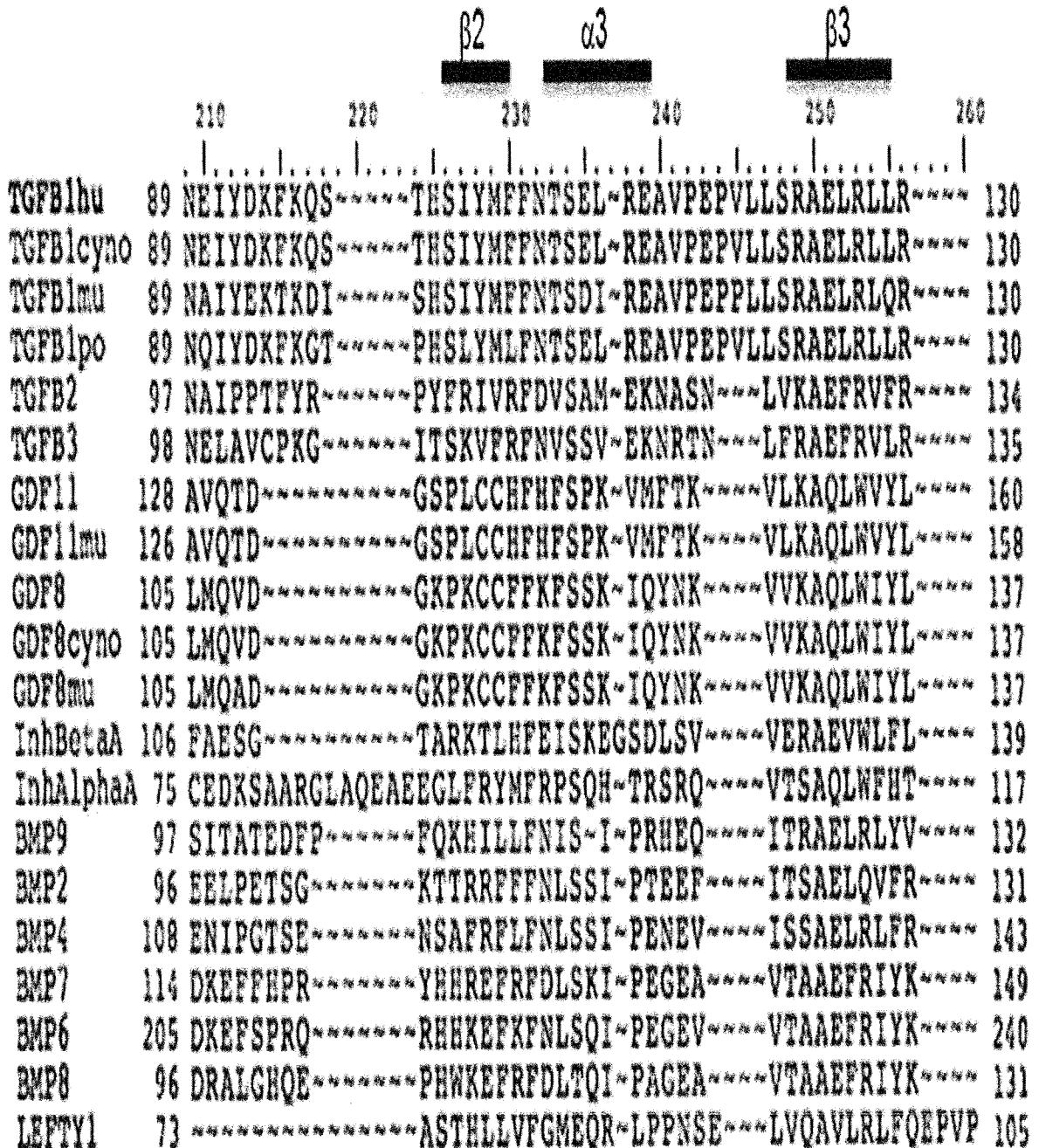


FIGURE 8B







## FIGURE 8B (CONTINUED)

		β7	Bowtie β8		Bowtie β9		
		◆ 370 ◆	◆ 380 ◆	390	400	410	
TGFB1hu	186	EGFRL	~ SAHCSCDSRD	~	~	~ NTLQ	204
TGFB1cyno	186	EGFRL	~ SAHCSCDSKD	~	~	~ NTLQ	204
TGFB1mu	186	QGFRF	~ SAHCSCDSKD	~	~	~ NKLH	204
TGFB1po	186	EGFRL	~ SAHCSCDSKD	~	~	~ NTLH	204
TGFB2	199	LGFKI	~ SLHCPCCTFVPSN	~	~	~ NYIIPNKSEELE	228
TGFB3	199	LGLEI	~ SIHCPCHTFQP~N	~	~	~ GDILENIHEVME	227
GDF11	231	WGIEI	~ NAFDPSGTDLAVT	~	~	~ SLG	251
GDF11mu	229	WGIEI	~ NAFDPSGTDLAVT	~	~	~ SLG	249
GDF8	200	LGIEI	~ KALDENGHDLAVT	~	~	~ FPG	220
GDF8cyno	200	LGIEI	~ KALDENGHDLAVT	~	~	~ FPG	220
GDF8mu	200	LGIEI	~ KALDENGHDLAVT	~	~	~ FPG	220
InhBetaA	218	LDVRIACEQCQESGASLVL	LGKKKKKEEGEGKKKGGGEGGAG	~	~	~	260
InhAlphaA	178	LLLRC	~ PLCTCSA	~	~	~	189
BMP9	202	NKLEV	~ TVE	~	~	~	209
BMP2	201	HGFVV	~ EVAHLEEKQGVSK	~	~	~	218
BMP4	213	YGLAI	~ EVTHLHQTRTHQG	~	~	~	230
BMP7	214	LGLQL	~ SVETLDGQSINPK	~	~	~ LAGL	235
BMP6	305	MGLQL	~ SVVTRDGVVHPR	~	~	~ AAGL	326
BMP8	195	LGLRL	~ YVETEDGHSVDFG	~	~	~ LAGL	216
LEFTY1	176	LLLQV	~ SVQREHLGPLASC	~	~	~ AHKLV	198

FIGURE 8C

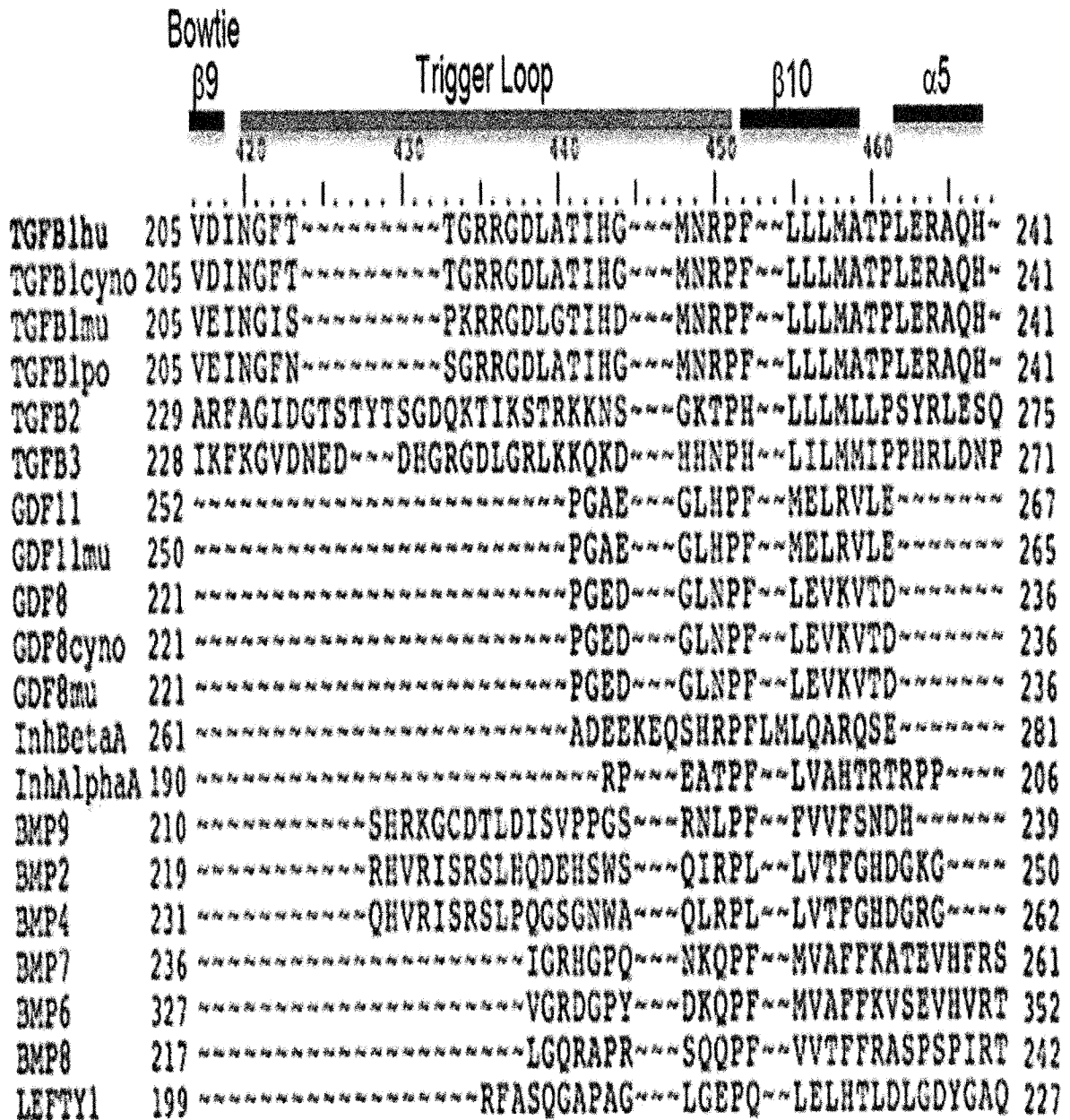
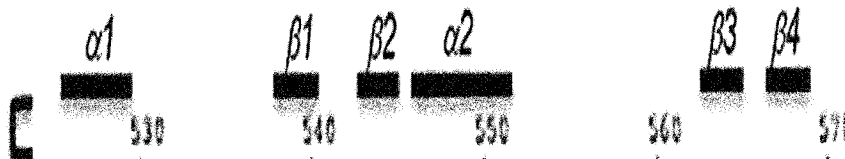


FIGURE 8C (CONTINUED)

		470	480	490	500	510	520	
TGFB1hu	242	..	..	..	..	..	..	249
TGFB1cyno	242	..	..	..	..	..	..	249
TGFB1mu	242	..	..	..	..	..	..	249
TGFB1po	242	..	..	..	..	..	..	249
TGFB2	276	..	..	..	..	..	..	283
TGFB3	272	..	..	..	..	..	..	280
GDF11	268	..	..	..	..	..	..	274
GDF11mu	266	..	..	..	..	..	..	272
GDF8	237	..	..	..	..	..	..	243
GDF8cyno	237	..	..	..	..	..	..	243
GDF8mu	237	..	..	..	..	..	..	243
InhBetaA	282	..	..	..	..	..	..	290
InhAlphaA	207	..	..	..	..	..	..	227
BMP9	240	..	..	..	..	..	..	288
BMP2	251	..	..	..	..	..	..	259
BMP4	263	..	..	..	..	..	..	273
BMP7	262	IR	..	..	..	..	..	285
BMP6	353	TR	..	..	..	..	..	376
BMP8	243	PR	..	..	..	..	..	265
LEFTY1	228	GD	..	..	..	..	..	229

FIGURE 8C (CONTINUED)



The diagram above the sequence shows domain boundaries:  $\alpha 1$  (residues 530-540),  $\beta 1$  (540-550),  $\beta 2$  (550-560),  $\alpha 2$  (560-570),  $\beta 3$  (570-580), and  $\beta 4$  (580-590). A 'C' is marked at the start of the sequence.

TGFB1hu	250	~ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGW~K~WIHEPKGYHANFCLGPC	297
TGFB1cyno	250	~ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGW~K~WIHEPKGYHANFCLGPC	297
TGFB1mu	250	~ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGW~K~WIHEPKGYHANFCLGPC	297
TGFB1po	250	~ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGW~K~WIHEPKGYHANFCLGPC	297
TGFB2	284	~ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGW~K~WIHEPKGYANFCAGAC	331
TGFB3	281	~ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGW~K~WVHEPKGYANFCSGPC	328
GDF11	275	~NLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFE~AFGW~DWI IAPKRYKANYCSGQC	321
GDF11mu	273	~NLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFE~AFGW~DWI IAPKRYKANYCSGQC	319
GDF8	244	~DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFE~AFGW~DWI IAPKRYKANYCSGEC	290
GDF8cyno	244	~DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFE~AFGW~DWI IAPKRYKANYCSGEC	290
GDF8mu	244	~DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFE~AFGW~DWI IAPKRYKANYCSGEC	290
InhBetaA	291	~GLECDGK~VNICCKKQ~FFVSFK~DIGW~NDWIIAPSGYHANYCEGEC	334
InhAlphaA	228	LRL LQR PPEE PAAHANCHRVALNISFQ~ELGW~ERWIVYPPSPFIFHYCHGGC	277
BMP9	289	GSTLARRKRSAGAGSHCQKTSLRVNFE~DIGW~DSWIIAPKEYEAYECKGGC	338
BMP2	260	~QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFS~DVGW~NDWIVAPPGYHAFYCHGEC	306
BMP4	274	~SPKHHSQRARKKNKNCRRHSLYVDFS~DVGW~NDWIVAPPGYQAFYCHGDC	322
BMP7	286	MAN~VAENSSDQRQACKKHELYVSFR~DLGW~QDWIIAPEGYAANYCEGEC	334
BMP6	377	VSS~ASDYNSSSELKTACRKHLYVSFQ~DLGW~QDWIIAPKGYAANYCDGEC	425
BMP8	266	LPGIFDDVVRGSHGRQVCRRHLYVSFQ~DLGW~LDWVIAPQGYSAIYCEGEC	315
LEFTY1	230	~CDPEAPMTEGTRCCRQEMYIDLQ~GMKWAENWVLEPPGFLAYECVGTG	276

FIGURE 8C (CONTINUED)

		580	590	600	610	620	
TGFB1hu	298	PYIWSLD	~TQYSKVLALYNQ	~H	~N	PGASAAPCC	~VPQALEPLP 336
TGFB1cyno	298	PYIWSLD	~TQYSKVLALYNQ	~H	~N	PGASAAPCC	~VPQALEPLP 336
TGFB1mu	298	PYIWSLD	~TQYSKVLALYNQ	~H	~N	PGASASPCC	~VPQALEPLP 336
TGFB1po	298	PYIWSLD	~TQYSKVLALYNQ	~H	~N	PGASAAPCC	~VPQALEPLP 336
TGFB2	332	PYLWSSD	~TQHSRVLSLYNT	~I	~N	PEASASPCC	~VSQDLEPLT 370
TGFB3	329	PYLRSAD	~TTHSTVLGLYNT	~L	~N	PEASASPCC	~VPQDLEPLT 367
GDF11	322	EYFMQKYPHT	~HLVQQ	~A	~N	PRGSAGPCC	~TPTKMSPIN 357
GDF11mu	320	EYFMQKYPHT	~HLVQQ	~A	~N	PRGSAGPCC	~TPTKMSPIN 355
GDF8	291	EFVFLQKYPHT	~HLVHQ	~A	~N	PRGSAGPCC	~TPTKMSPIN 326
GDF8cyno	291	EFVFLQKYPHT	~HLVHQ	~A	~N	PRGSAGPCC	~TPTKMSPIN 326
GDF8mu	291	EFVFLQKYPHT	~HLVHQ	~A	~N	PRGSAGPCC	~TPTKMSPIN 326
InhBetaA	335	PSHIAGTSGSS	~LSFESTVINHYMRGH	~S	~P	FANLKS	~VPTKLRPMS 380
InhAlphaA	278	GLNIPPNLSLPVPGAPPTPAQP	~Y	~S	LLPGAQPCCAALPGTMRPLH	321	
BMP9	339	FFPLADDVTPTKHAIVQTLVHL	~K	~F	PTKV GKACC	~VPTKLSPI 380	
BMP2	307	PFPLADHLNSTNHAIVQTLVNS	~V	~N	SKIPKACC	~VPTELSAIS 347	
BMP4	323	PFPLADHLNSTNHAIVQTLVNS	~V	~N	NSSIPKACC	~VPTELSAIS 363	
BMP7	335	AFPLNSYMNATNHAIVQTLVHF	~I	~N	PETV PKPCC	~APTQLNAIS 376	
BMP6	426	SFPLNABMNATNHAIVQTLVHL	~M	~N	PEYV PKPCC	~APTQLNAIS 467	
BMP8	316	SFPLDSCMNATNHAILQSLVHL	~M	~K	PNAV PKACC	~APTCLSATS 357	
LEFTY1	277	RQPPEAL	~APKW PFLGPRQC	~I	~A	SETDSL 304	





Figure 9A

	TGF81hu	TGF81po	TGF82	TGF83	GDF11	GDF8	Inh8eta	InhAlph	BMP9	BMP2	BMP4	BMP7	BMP6	BMP8	LEFTY1
TGF81hu	100	94	42	46	19	22	16	14	14	19	18	18	16	17	15
TGF81po	94	100	42	46	20	22	15	14	14	19	19	18	15	17	15
TGF82	42	42	100	55	18	20	13	12	13	21	19	18	15	16	15
TGF83	46	46	55	100	19	21	14	13	14	19	18	20	17	19	14
GDF11	19	20	18	19	100	61	21	15	15	18	18	17	18	16	13
GDF8	22	22	20	21	61	100	24	14	16	20	18	18	17	19	12
Inh8etaA	16	15	13	14	21	24	100	12	15	18	18	17	15	19	9
InhAlphaA	14	14	12	13	15	14	12	100	14	11	12	13	10	13	13
BMP9	14	14	13	14	15	16	15	14	100	24	25	21	20	21	11
BMP2	19	19	21	19	18	20	18	11	24	100	59	26	23	25	15
BMP4	18	19	19	18	18	18	18	12	25	59	100	25	24	26	14
BMP7	18	18	18	20	17	18	17	13	21	26	25	100	54	50	12
BMP6	16	15	15	17	18	17	15	10	20	23	24	54	100	42	11
BMP8	17	17	16	19	16	19	19	13	21	25	26	50	42	100	12
LEFTY1	15	15	15	14	13	12	9	13	11	15	14	12	11	12	100

Figure 9B

	TGFB1hu	TGFB1po	TGFB2	TGFB3	GDF11	GDF8	InhBetaA	InhAlphaA	BMP9	BMP2	BMP4	BMP7	BMP6	BMP8	LEFTY1
TGFB1hu	100	100	83	86	48	47	44	34	36	43	44	44	46	41	32
TGFB1po	100	100	83	86	48	47	44	34	36	43	44	44	46	41	32
TGFB2	83	83	100	89	50	49	47	37	37	47	47	48	49	46	30
TGFB3	86	86	89	100	50	49	46	36	36	47	46	46	50	44	30
GDF11	48	48	50	50	100	94	52	37	45	47	44	50	50	45	29
GDF8	47	47	49	49	94	100	51	34	44	47	44	49	50	45	27
InhBetaA	44	44	47	46	52	51	100	40	47	53	52	55	56	52	27
InhAlphaA	34	34	37	36	37	34	40	100	40	41	39	42	42	39	26
BMP9	36	36	37	36	45	44	47	40	100	60	56	56	59	57	28
BMP2	43	43	47	47	47	47	53	41	60	100	88	69	71	68	30
BMP4	44	44	47	46	44	44	52	39	56	88	100	66	66	67	29
BMP7	44	44	48	46	50	49	55	42	56	69	66	100	90	78	29
BMP6	46	46	49	50	50	50	56	42	59	71	66	90	100	81	30
BMP8	41	41	46	44	45	45	52	39	57	68	67	78	81	100	31
LEFTY1	32	32	30	30	29	27	27	26	28	30	29	29	30	31	100

Figure 9C

	TGFβ1hu	TGFβ1po	TGFβ2	TGFβ3	GDF11	GDF8	InhβtoA	InhAlphaA	BMP9	BMP2	BMP4	BMP7	BMP6	BMP8	LEFTY1
TGFβ1hu	100	92	30	34	14	17	10	10	9	14	14	13	11	13	13
TGFβ1po	92	100	31	35	15	17	10	11	10	14	14	13	10	13	13
TGFβ2	30	31	100	46	13	16	7	8	8	17	14	13	10	11	14
TGFβ3	34	35	46	100	13	16	9	9	9	15	14	15	11	14	11
GDF11	14	15	13	13	100	50	16	12	9	12	13	11	12	10	13
GDF8	17	17	16	16	50	100	19	11	10	13	13	11	10	13	11
InhβtoA	10	10	7	9	16	19	100	9	9	10	11	9	8	13	8
InhAlphaA	10	11	8	9	12	11	9	100	11	8	9	10	7	11	11
BMP9	9	10	8	9	9	10	9	11	100	16	17	13	12	13	10
BMP2	14	14	17	15	12	13	10	8	16	100	49	17	14	16	14
BMP4	14	14	14	14	13	13	11	9	17	49	100	17	16	17	13
BMP7	13	13	13	15	11	11	9	10	13	17	17	100	46	43	11
BMP6	11	10	10	11	12	10	8	7	12	14	16	46	100	34	8
BMP8	13	13	11	14	10	13	13	11	13	16	17	43	34	100	9
LEFTY1	13	13	14	11	13	11	8	11	10	14	13	11	8	9	100





Figure 11

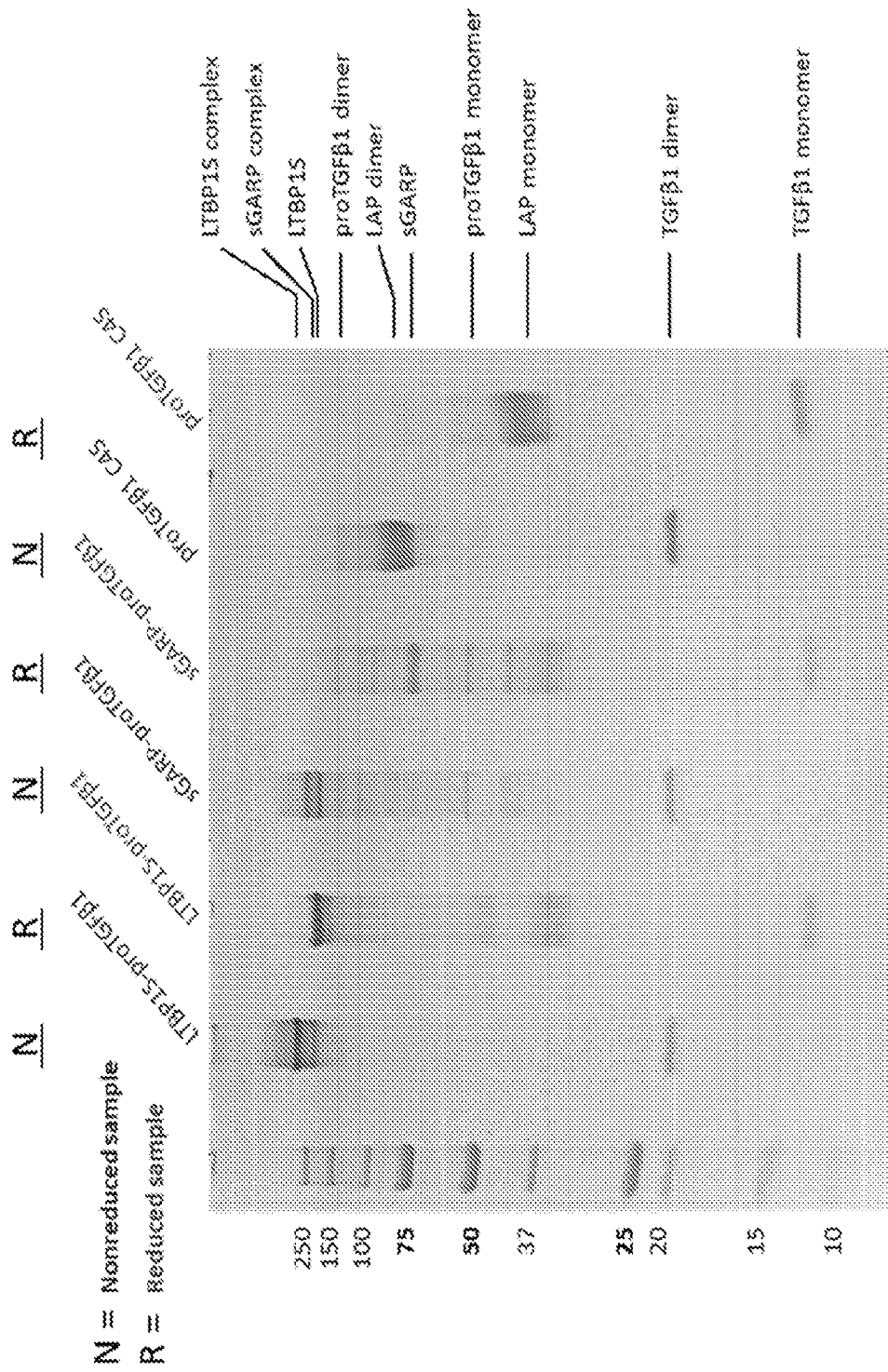


Figure 12

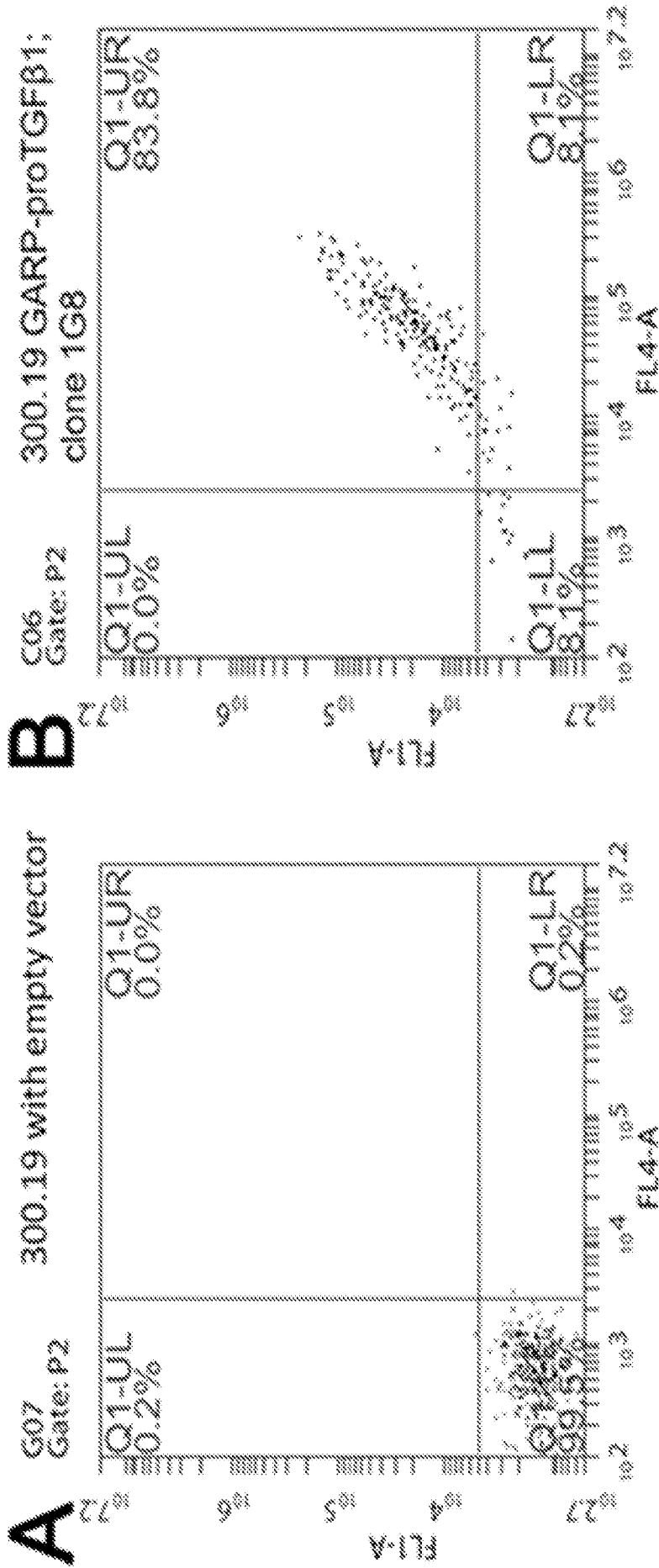


Figure 12 (Continued)

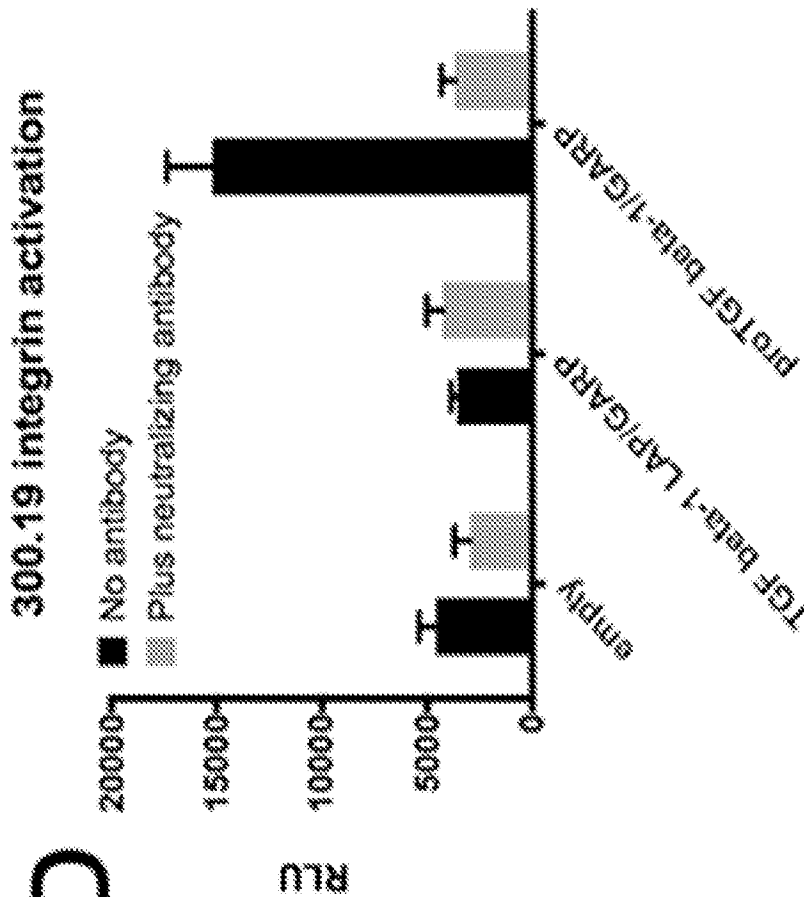
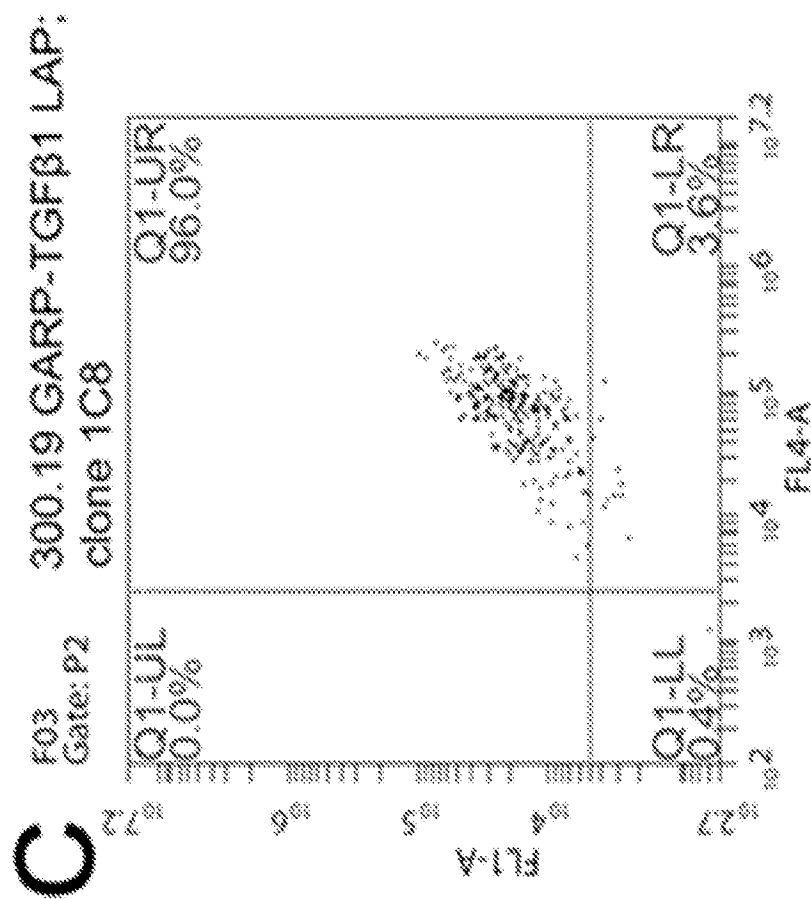
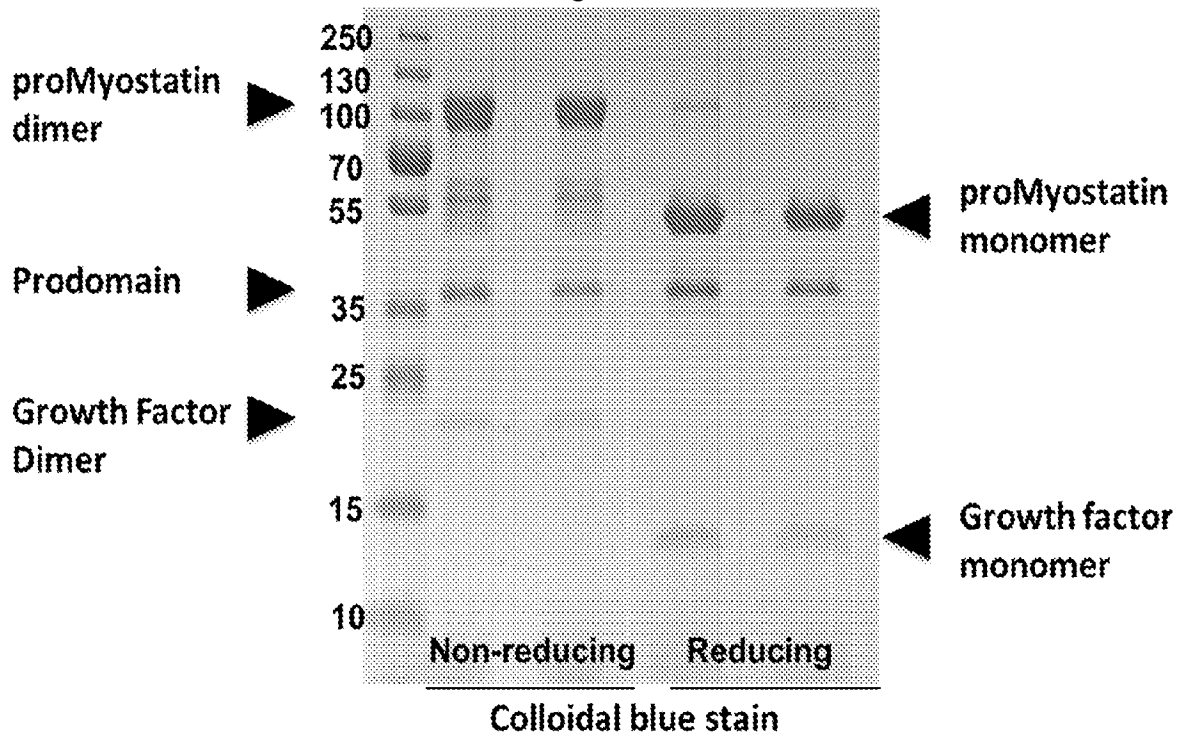


Figure 13



## EX6050R – TRADUZIONE LEGENDE

Figure 1	Figura 1
Myostatin	Miostatina
Inhibin	Inibina
Anti-Mullerian hormone	Ormone anti-Mulleriano
Lefty	Lefty
Nodal	Nodal
Figure 2	Figura 2
Prodomain	Prodominio
Growth factor	Fattore di crescita
Secretion signal peptide	Peptide segnale di secrezione
Cleavage site	Sito di clivaggio
Figure 3	Figura 3
Growth Factor-Prodomain Complex (GPC)	Complesso Fattore di Crescita-Prodominio (GPC)
Free Growth Factor Dimer	Dimero di Fattore di Crescita Libero
Free Latency Associated Peptide (LAP) Dimer	Dimero di Peptide Associato a Latenza (LAP) libero
Figure 4	Figura 4
Free Latency Associated Peptide (LAP) Dimer	Dimero di Peptide Associato a Latenza (LAP) libero
Trigger loop	Loop di innesco
Alpha 2 helix	Alfa elica 2
Fastener region	Regione gancio
Bowtie region	Regione cravatta a farfalla
Arm region	Regione braccio
Latency loop (also referred to as the latency lasso)	Loop di latenza (anche riferito come il lazo di latenza)
Alpha 1 helix	Alfa elica 1

Residues for extracellular protein associations	Residui per associazioni con proteine extracellulari
Free Growth Factor Dimer	Dimero di Fattore di Crescita Libero
Finger region	Regione dita
Figure 5	Figura 5
An embodiment of a recombinant GPC	Una forma di realizzazione di un GPC ricombinante
Disulfide bond	Legame disolfuro
Growth factor domain	Dominio di fattore di crescita
Proprotein convertase cleavage site	Sito di clivaggio per proproteina convertasi
Latency-associated peptide (LAP)	Peptide associato a latenza (LAP)
Cys residue	Residuo Cys
Histidine tags	Istidina tag
C-terminus	C-terminale
N-terminus	N-terminale
Figure 6	Figura 6
An embodiment of a proprotein convertase cleavage site mutant	Una forma di realizzazione di un mutante nel sito di clivaggio per proproteina convertasi
E.g.	Ad esempio
An embodiment of an N-terminal cysteine mutant	Una forma di realizzazione di un mutante nella cisteina N-terminale
Figure 7	Figura 7
Embodiments of recombinant proteins	Forme di realizzazione di proteine ricombinanti
proTGF- $\beta$ proprotein convertase cleavage site mutant with N-terminal cysteine mutation	proTGF- $\beta$ mutante nel sito di clivaggio per proproteina convertasi con mutazione nella cisteina N-terminale
proTGF- $\beta$ proprotein convertase cleavage site mutant complexed with LTBP	proTGF- $\beta$ mutante nel sito di clivaggio per proproteina convertasi complessata con LTBP

proTGF- $\beta$ proprotein convertase cleavage site mutant complexed with GARP	proTGF- $\beta$ mutante nel sito di clivaggio per proproteina convertasi complessata con GARP
TGF- $\beta$ LAP with N-terminal cysteine mutation	TGF- $\beta$ LAP con mutazione nella cisteina N-terminale
TGF- $\beta$ LAP complexed with GARP	TGF- $\beta$ LAP complessato con GARP
Figure 8	Figura 8
$\alpha$ 1 Helix	Elica $\alpha$ 1
Latency lasso	Lazo di latenza
Fastener	Gancio
Bowtie	Cravatta a farfalla
Trigger loop	Loop di innesco
Continued	Proseguimento
Figure 9	Figura 9
Figure 10	Figura 10
Myostatin	Miostatin
Inhibin A	Inibina A
Myostatin dimer	Dimero di miostatina
Continued	Proseguimento
Figure 11	Figura 11
N = Nonreduced sample	N = campione non ridotto
R = Reduced sample	R = campione ridotto
Complex	Complesso
Dimer	Dimero
Monomer	Monomero
Figure 12	Figura 12
300.19 with empty vector	300.19 con vettore vuoto

Gate	Gate
Clone	Clone
300.19 integrin activation	300.19 attivazione con integrina
No antibody	No anticorpo
Plus neutralizing antibody	Più anticorpo neutralizzante
Empty	Vuoto
Continued	Proseguimento
Figure 13	Figura 13
proMyostatin dimer	Dimero di proMiostatina
Prodomain	Prodominio
Growth Factor Dimer	Dimero di Fattore di Crescita
ProMyostatin monomer	Monomero di proMiostatina
Growth factor monomer	Monomero di fattore di crescita
Non-reducing	Non-riducenti
Reducing	Riducenti
Colloidal blue stain	Colorazione blu colloidale