

Brevetto europeo No. 3177307

Domanda di brevetto europeo No. 15750560.3

Data di deposito: 05 agosto 2015

Classificazione IPC: A61K38/00, C07K14/55

5 Classificazione CPC: C07K14/55 (EP,CN,IL,KR,US); A61K38/00 (EP,CN,IL,KR,US); A61P1/00 (EP,IL);  
A61P1/04 (EP,IL); A61P1/12 (EP,IL); A61P17/06 (EP,IL); (+)

Priorità: Statunitense No. 201462033726P del 06 agosto 2014

Titolo: PROTEINE DI FUSIONE INTERLEUCHINA-2/RECETTORE PER L'INTERLEUCHINA-2 ALFA E  
METODI DI UTILIZZO

10 Richiedente: The University of Miami  
1951 NW 7th Avenue  
Suite 110  
Miami, Florida 33136  
U.S.A.

15 Inventore: MALEK, Thomas

\*\*\*\*\*

Descrizione

CAMPO DELL'INVENZIONE

20 La materia oggetto presentemente divulgata riguarda in generale proteine di fusione interleuchina2/recettore  
per l'interleuchina-2 alfa, e metodi e composizioni per modulare la risposta immunitaria impiegando tali proteine di  
fusione.

DICHIARAZIONE DI FINANZIAMENTO FEDERALE

25 Questa invenzione è stata realizzata con il supporto del Governo nell'ambito del finanziamento numero RO1  
DK093866, assegnato dal National Institute of Health (NIH), National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney  
Diseases (NIDDK). Il Governo detiene certi diritti sull'invenzione.

## SFONDO DELL'INVENZIONE

L'interleuchina-2 (IL-2) è una sostanza biologica che è stata usata in tentativi di rafforzare le risposte immunitarie nei pazienti con cancro e HIV/AIDS. In tempi più recenti, IL-2 è stata usata a dosi più basse per rafforzare selettivamente la tolleranza, allo scopo di sopprimere le risposte immunitarie indesiderate che sono associate agli attacchi di tipo autoimmune dei tessuti self. È importante notare che queste basse dosi di IL-2 non mostravano segni di potenziamento o riattivazione delle cellule T autoreattive. Tuttavia, IL-2 palesa inconvenienti importanti in quanto sostanza terapeutica, incluse un'emivita molto breve in vivo che ne limita l'efficacia, e una tossicità ad alte dosi. Per queste ragioni, sono necessari nuovi farmaci biologici a base di IL-2 che abbiano una farmacocinetica migliorata e risposte durature per l'uso.

Lo sviluppo di proteine di fusione all'interleuchina-2 di tipo attenuato e attivabili da proteasi è descritto in Puskas et al., *Immunology.*, giu 2011; 133(2):206-220, e in WO 2011/123683. La proteina di fusione Albuleukin è un'interleuchina-2 umana ricombinante geneticamente fusa ad una sieralbumina umana ricombinante. Viene riferito che Albuleukin ha un'efficacia terapeutica migliorata nei topi in virtù della sua emivita prolungata in vivo (Melder et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, giu 2005; 54(6):535-47). La fusione di una citochina al suo recettore extracellulare potrebbe dare vita ad un agonista potente e a lunga durata d'azione con lente velocità di assorbimento ed eliminazione (Wilkinson et al., *Nat. Med.*, set 2007; 13(9):1108-13).

## RIEPILOGO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda, in un primo aspetto, una proteina di fusione comprendente: (a) un primo polipeptide comprendente un'interleuchina-2 (IL-2); in cui il primo polipeptide ha un'identità di sequenza di almeno 70% con SEQ ID NO:2 (b) un secondo polipeptide, fuso in cornice al primo polipeptide per mezzo di un raccordo, in cui il raccordo è la sequenza riportata in SEQ ID NO:13, e in cui il secondo polipeptide comprende un dominio extracellulare di un recettore per l'interleuchina-2 alfa (IL-2R $\alpha$ ), in cui il secondo polipeptide ha un'identità di sequenza di almeno 70% con SEQ ID NO:7; che ha un'attività biologica del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ ; in cui la proteina di fusione ha un'attività di IL-2 aumentata rispetto alla IL-2 nativa; o in cui la proteina di fusione ha una stimolazione IL-2-mediata persistente aumentata dei linfociti portatori di IL-2R in vivo rispetto alla IL-2 nativa.

In una seconda forma esecutiva, il primo polipeptide comprendente IL-2 ha un'identità di sequenza di almeno 75%, almeno 85%, almeno 90%, almeno 95%, almeno 99% o 100% con SEQ ID NO:2.

5 In una terza forma esecutiva, il secondo polipeptide comprendente il dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  ha un'identità di sequenza di almeno 75%, almeno 85%, almeno 90%, almeno 95%, almeno 99% o 100% con SEQ ID NO:7.

In una quarta forma esecutiva, la proteina di fusione dell'invenzione comprende (a) la sequenza di amminoacidi di una qualsiasi di SEQ ID NO:26, 27, 36, 37, 57 o 59; o (b) una sequenza avente un'identità di sequenza di almeno 80%, 85%, 90% o 95% con una qualsiasi di SEQ ID NO:26, 27, 36, 57 o 59.

10 In una quinta forma esecutiva, la proteina di fusione comprende: la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:62; o una sequenza avente un'identità di sequenza di almeno 80%, 85%, 90% o 95% con SEQ ID NO:62.

In un secondo aspetto, l'invenzione riguarda un polinucleotide comprendente una sequenza di nucleotidi codificante per la proteina di fusione dell'invenzione.

In un terzo aspetto, l'invenzione riguarda una cellula ospite comprendente il polinucleotide codificante per la proteina di fusione dell'invenzione

15 In un quarto aspetto, l'invenzione riguarda un metodo di produzione della proteina di fusione dell'invenzione, il metodo prevedendo di esprimere il polinucleotide codificante per la proteina di fusione dell'invenzione nelle cellule ospiti qui divulgate, e recuperare la proteina di fusione così prodotta.

In un quinto aspetto, l'invenzione riguarda la proteina di fusione dell'invenzione per l'uso nel diminuire la risposta immunitaria in un soggetto bisognoso.

20 In una prima forma esecutiva di detto quinto aspetto, il soggetto ha una malattia autoimmune; opzionalmente in cui la malattia autoimmune è selezionata dal gruppo costituito da diabete di tipo 1, sclerosi multipla, artrite reumatoide, celiachia, lupus eritematoso sistemico, artrite idiopatica giovanile, morbo di Crohn, colite ulcerosa o sclerosi sistemica, malattia dell'innesto contro l'ospite, psoriasi, alopecia areata, e vasculite indotta da HCV.

25 In una seconda forma esecutiva, una quantità terapeuticamente efficace della proteina di fusione comprende da  $10^3$  a  $10^6$  IU di attività di IL-2 per adulto o  $10^4 \pm 100$  volte di attività di IL-2 per adulto.

In una terza forma esecutiva, il soggetto è un umano.

In un sesto aspetto, l'invenzione riguarda la proteina di fusione dell'invenzione per l'uso nel potenziare l'immunogenicità di un vaccino in un soggetto bisognoso o nel superare una risposta immunitaria soppressa ad un vaccino in un soggetto bisognoso.

5 In una prima forma esecutiva di detto sesto aspetto, la proteina di fusione e il vaccino vanno somministrati simultaneamente.

In una seconda forma esecutiva, la proteina di fusione e il vaccino vanno somministrati in sequenza in qualsiasi ordine.

In una terza forma esecutiva, detto vaccino è un vaccino anticancro.

10 In una quarta forma esecutiva, una quantità terapeuticamente efficace della proteina di fusione comprende da almeno  $10^4$  a  $10^7$  IU di attività di IL-2 per adulto o almeno  $10^5 \pm 10$  di attività di IL-2 per adulto.

In una forma esecutiva, il soggetto è un umano.

#### BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

15 La FIG. 1 fornisce uno schema per una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  dove L = peptide leader, LK = regione di raccordo, G = glicina, H = istidina, e T = codone di terminazione.

La FIG. 2A e la FIG. 2B forniscono le sequenze proteiche dedotte di esempi non limitativi di proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . La FIG. 2A fornisce le sequenze proteiche dedotte di esempi non limitativi di proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  murine. Le sequenze della IL-2 murina e dell'IL-2R $\alpha$  murino delle proteine di fusione sono rispettivamente mostrate sopra e sotto. La sequenza designata come IL-2 è riportata in SEQ ID NO:3; la sequenza designata come IL-2-(G4S)4-IL-2R $\alpha$  è riportata in SEQ ID NO:54; la sequenza designata come IL-2-(G4S)5-IL-2R $\alpha$  è riportata in SEQ ID NO:55; la sequenza designata come IL-2-(G3S)4-IL-2R $\alpha$  è riportata in SEQ ID NO:56; la sequenza designata come IL-2-(G3S)3-IL-2R $\alpha$  è riportata in SEQ ID NO:57; e il dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  è riportato in SEQ ID NO:10. La FIG. 2B fornisce le sequenze proteiche dedotte di esempi non limitativi di proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  umane. Le sequenze della IL-2 umana e dell'IL-2R $\alpha$  umano delle proteine di fusione sono  
20  
25 rispettivamente mostrate sopra e sotto. La sequenza designata come IL-2 è riportata in SEQ ID NO:1; la sequenza

designata come IL-2-(G3S)2-IL-2R $\alpha$  è riportata in SEQ ID NO:58; la sequenza designata come IL-2-(G3S)3-IL-2R $\alpha$  è riportata in SEQ ID NO:59; la sequenza designata come IL-2-(G3S)4-IL-2R $\alpha$  è riportata in SEQ ID NO:60; la sequenza riportata come IL-2-(G4S)4-IL-2R $\alpha$  è riportata in SEQ ID NO:61; e il dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  è riportato in SEQ ID NO:7.

5 La FIG. 3 mostra la bioattività delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . Cellule COS-7 sono state trasfettate con i cDNA di fusioni IL-2/IL-2R $\alpha$  con i raccordi indicati. I sovranatanti di queste cellule sono stati coltivati con blasti di cellule T attivati con anti-CD3 per accertare l'attività di IL-2. (A) Risposte proliferative dei blasti T dopo diluizioni delle proteine di fusione indicate. (B) Effetto di un anti-IL-2 sulla proliferazione stimolata da una diluizione 1:2 del sovranatante di coltura contenente le proteine di fusione indicate.

10 La FIG. 4 mostra l'attività delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  purificate. Usando i sovranatanti di cellule CHO trasfettate, IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  e IL-2/(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>/IL-R $\alpha$  sono state purificate via cromatografia di affinità basata su nichel per l'etichetta 6x-His. (A) Misura della bioattività di IL-2 basata sulla proliferazione di blasti di cellule T attivati con anti-CD3 per la proteina di fusione purificata indicata. (B) Effetto di ciascuna proteina di fusione purificata nell'inibire il legame degli anticorpi monoclonali anti-IL-2R $\alpha$  PC61 e 7D4, diretti ad un sito non legante il ligando, a blasti di cellule T attivati con anti-CD3.

15 La FIG. 5 mostra che un anticorpo monoclonale anti-IL-2R $\alpha$  che è diretto al sito legante IL-2 di IL-2R $\alpha$  non è in grado di legarsi alla proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . Le proteine di fusione purificate con raccordi variabili, come indicato, sono state innanzitutto incubate con l'anticorpo monoclonale anti-IL-2R $\alpha$  3C7, che è diretto al sito legante il ligando di IL-2R $\alpha$ , o con l'anticorpo monoclonale 7D4, che è diretto ad un sito non legante il ligando di IL-2R $\alpha$ .

20 La capacità di 3C7 o 7D4 di legarsi poi all'IL-2R $\alpha$  sulla superficie cellulare è stata accertata usando cellule EL4 trasfettate con IL-2R $\alpha$ .

La FIG. 6 mostra le proprietà biochimiche di una IL-2/IL-2R $\alpha$  purificata. (A) La IL-2/IL-2R $\alpha$  purificata è stata sottoposta a SDS-PAGE in condizioni riducenti e non riducenti; IL-2/IL-2R $\alpha$  è stata visualizzata tramite analisi in Western blot sondando con un anticorpo diretto contro l'etichetta 6x-His della proteina di fusione. (B) La quantità

indicata di IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  purificata è stata sottoposta a SDS-PAGE in condizioni riducenti seguita da colorazione con blu di Coomassie.

La FIG. 7 mostra l'effetto della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  sulla trasduzione del segnale dipendente da IL-2 in vivo. I livelli di pSTAT5 nelle popolazioni di cellule di milza indicate sono stati accertati subito dopo una singola  
5 iniezione i.p. di IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  (4000 unità di attività di IL-2) in topi C57BL/6. I livelli di pSTAT5 sono stati determinati 0,5 h dopo l'iniezione della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . Per le cellule T CD4<sup>+</sup>, le cellule sono state classificate in gate per escludere le cellule Treg Foxp3<sup>+</sup>.

La FIG. 8 mostra l'effetto della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  sulle cellule Treg in vivo. Topi NOD sono stati  
10 iniettati i.p. 3 volte (Giorni 1, 3, 5) con la quantità indicata di attività di IL-2 associata a IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$ . L'effetto sulle Treg nella milza, nei linfonodi pancreatici (PLN) e nel pancreas è stato accertato 24 h dopo l'ultima iniezione. Sono stati valutati la proporzione di Treg nelle cellule T CD4<sup>+</sup>; l'intensità di fluorescenza media (MFI) per l'espressione di CD25 da parte delle Treg dopo averla normalizzata contro l'espressione di CD25 da parte delle Treg di topi trattati di controllo; lo stato proliferativo delle Treg, come accertato in base all'espressione del marcatore proliferativo Ki67; e la % di Treg esprimenti Klrp1, che marca una sottopopolazione terminalmente differenziata  
15 dipendente da IL-2.

La FIG. 9 mostra il confronto tra una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  e una IL-2 ricombinante in termini di capacità di indurre cambiamenti nelle cellule Treg in vivo. Topi C57BL/6 sono stati iniettati i.p. 3 volte (Giorni 1, 3, 5) con  
20 IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  (2000 Unità), con una IL-2 umana ricombinante (25.000 Unità), o con complessi preformati di un anti-IL-2 (Jes-6.1; 5  $\mu$ g) con una IL-2 di topo (10.000 Unità) (IL2/IC). L'effetto sulle Treg nella milza è stato accertato 24 h, 72 h e 1 settimana (s) dopo l'ultima iniezione. Le Treg sono state valutate come descritto nella FIG. 8.

La FIG. 10 mostra che l'applicazione limitata di una IL-2 a bassa dose ritarda il diabete nei topi NOD. I topi NOD (8  
25 topi/gruppo) hanno ricevuto IL-2/IL-2R $\alpha$ , una IL-2R $\alpha$  solubile o PBS secondo il calendario in (A). I livelli di glucosio nelle urine e nel sangue sono stati monitorati fino a quando i topi non hanno raggiunto un'età di 40 settimane. I topi venivano considerati diabetici dopo 2 letture consecutive di livelli di glucosio >250 mg/dl.

La FIG. 11 dimostra che IL-2/IL-2R $\alpha$  ad alta dose potenzia lo sviluppo della memoria nelle cellule T CD8<sup>+</sup>. Topi C57BL/6 hanno ricevuto cellule T congeniche specifiche per l'ovalbumina (OVA) e ristrette per la classe I che erano transgeniche per il recettore delle cellule T. Questi topi sono stati immunizzati e trattati con una singola applicazione della proteina di fusione IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$ , di un complesso IL2/IC contenente 15.000 unità di IL-2, o di una IL-2 ricombinante (25.000 Unità). Nei tempi indicati, è stata accertata la proporzione relativa di cellule T OT-I all'interno del compartimento di cellule T CD8<sup>+</sup> totali nel sangue periferico.

La FIG. 12 mostra il tipo di cellule di memoria OT-I persistenti che viene supportato da una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  ad alta dose: (A) Strategia di classificazione in gate per identificare le cellule di memoria effettrici (EM) e le cellule di memoria centrale (CM). (B) Distribuzione delle cellule di memoria OT-I 28 e 202 giorni dopo l'immunizzazione in topi che avevano anche ricevuto IL-2/IL-2R $\alpha$  (12.000 unità).

La FIG. 13 mostra la caratterizzazione di proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  umane contenenti raccordi di glicina/serina di lunghezza variabile, come mostrato. (A) Bioattività delle IL-2/IL-2R $\alpha$  umane purificate usando il biosaggio con CTLL. (B) Analisi in Western blot di proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  umane dopo una SDS-PAGE in condizioni riducenti.

La FIG. 14 mostra che la proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  umana lega anticorpi monoclonali anti-IL-2R $\alpha$ .

Le proteine di fusione purificate con i raccordi indicati sono state innanzitutto incubate con l'anticorpo monoclonale anti-IL-2R $\alpha$  BC96, che è diretto alla regione legante il ligando dell'IL-2R $\alpha$  umano, o con l'anticorpo monoclonale MA257, che è diretto ad una regione non legante il ligando dell'IL-2R $\alpha$  umano. La capacità di BC96 o M-A257 di legarsi poi all'IL-2R $\alpha$  sulla superficie cellulare è stata accertata usando cellule CHO trasfettate con IL-2R $\alpha$ .

La FIG. 15 mostra che, nel contesto delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  umane, IL-2 interagisce con il sito legante IL-2 di IL-2R $\alpha$ . La bioattività di IL-2 nelle proteine di fusione indicate con raccordi di glicina/serina variabili è stata accertata usando cellule CTLL. Mut identifica proteine di fusione dove IL-2R $\alpha$  conteneva le mutazioni Arg<sup>35</sup> → Thr, Arg<sup>36</sup> → Ser. L'analisi in Western blot confermava la presenza di quantità simili di tutte le proteine di fusione (non mostrato).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Le presenti invenzioni verranno ora descritte qui sotto con maggiore dovizia di particolari facendo riferimento ai disegni accompagnatori che mostrano alcune, ma non tutte, le forme esecutive dell'invenzione.

5 In realtà, queste invenzioni potranno essere implementate in molte forme differenti, e non andranno interpretate come limitate alle forme esecutive qui riportate; piuttosto, queste forme esecutive vengono fornite affinché questa divulgazione possa ottemperare ai requisiti di legge applicabili. Numeri simili identificano elementi simili in tutte le figure.

10 Sulla scorta degli insegnamenti presentati nelle descrizioni che precedono e nei disegni associati, un esperto nel ramo a cui appartiene questa invenzione saprà escogitare molte modifiche e altre forme esecutive delle invenzioni qui riportate. Pertanto, resterà inteso che le invenzioni non andranno limitate alle specifiche forme esecutive divulgate, e che l'ambito della presente invenzione, definito nelle rivendicazioni allegate, intende abbracciare modifiche e altre forme esecutive. Benché vengano qui adottati termini specifici, essi vengono esclusivamente adoperati in senso generico e descrittivo, e non per scopi di limitazione.

#### I. Panoramica

15 La tecnologia corrente è basata sull'uso di un'interleuchina-2 (IL-2) ricombinante che ha cattive proprietà farmacologiche, soprattutto una breve emivita che ne limita l'utilità. Vengono qui divulgate proteine di fusione interleuchina-2/recettore per l'interleuchina-2 alfa (IL-2/IL-2R $\alpha$ ) aventi proprietà intrinseche che le differenziano da una IL-2 ricombinante e da altre proteine di fusione a IL-2. Per prima cosa, la dimensione delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  aumenterà la loro emivita in vivo. In secondo luogo, la debole interazione tra IL-2 e IL-2R $\alpha$  (una delle subunità di IL-2R) nel contesto delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  fornisce un altro meccanismo per prolungare la disponibilità di IL-2. Senza volersi limitare allo specifico meccanismo d'azione, è possibile che la disponibilità prolungata dell'attività di IL-2 sia il risultato di un'interazione competitiva della porzione IL-2 con IL-2R $\alpha$  nella fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  e con le cellule che esprimono IL-2R.

#### II. Proteine di fusione interleuchina-2/recettore per l'interleuchina-2 alfa, e polinucleotidi codificanti per le stesse

25 Vengono qui divulgate proteine di fusione che comprendono un primo polipeptide comprendente un'interleuchina-2 (IL-2) o una sua variante o frammento funzionale, fuso in cornice ad un secondo polipeptide

comprendente o costituito dal dominio extracellulare del recettore per l'interleuchina-2 alfa (IL-2R $\alpha$ ) o da una sua variante o frammento funzionale. Secondo l'invenzione, la proteina di fusione comprende un primo polipeptide comprendente una IL-2 e avente un'identità di sequenza di almeno 70% con SEQ ID NO:2; e un secondo polipeptide, fuso in cornice al primo polipeptide per mezzo di un raccordo, in cui il raccordo è la sequenza riportata in SEQ ID NO:13, e in cui il secondo polipeptide comprende un dominio extracellulare di un recettore per l'interleuchina-2 alfa (IL-2R $\alpha$ ), in cui il secondo polipeptide ha un'identità di sequenza di almeno 70% con SEQ ID NO:7; che ha un'attività biologica del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ .

Nel presente contesto, una "proteina di fusione" identifica il collegamento genetico in cornice di almeno due polipeptidi eterologhi. La formazione di una singola proteina avviene in sede di trascrizione/traduzione. Ciò permette di incorporare molteplici proteine, o loro frammenti, in un singolo polipeptide. Il termine "operativamente collegato" intende significare un collegamento funzionale tra due o più elementi. Ad esempio, un collegamento operativo tra due polipeptidi fonde i due polipeptidi insieme in cornice per produrre una proteina di fusione che è un singolo polipeptide. In un aspetto particolare, la proteina di fusione comprende inoltre un terzo polipeptide che, come discusso sotto più nel dettaglio, può comprendere una sequenza di raccordo.

Le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ , o loro varianti o frammenti attivi qui divulgati, possono avere una o più delle seguenti proprietà/attività: (1) aumentare l'attività delle cellule T regolatorie (Treg) e/o aumentare la tolleranza immunitaria nelle terapie basate su IL-2 a bassa dose; (2) aumentare la risposta immunitaria e la memoria nelle terapie a dose più alta; (3) aumentare la disponibilità di IL-2 rispetto ad una IL-2 ricombinante; e/o (4) aumentare la stimolazione IL-2-mediata persistente dei linfociti portatori di IL-2R in vivo. Tali attività, e loro metodi di saggio, sono qui divulgati in ulteriore dettaglio altrove. Vedere ad esempio l'Esempio 1 qui fornito. Secondo l'invenzione, la proteina di fusione ha un'attività di IL-2 aumentata o una stimolazione IL-2-mediata persistente aumentata dei linfociti portatori di IL-2R in vivo rispetto alla IL-2 nativa.

In una forma esecutiva non limitativa, l'attività aumentata delle Treg che viene ottenuta con le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  o con loro varianti o frammenti attivi qui divulgati può essere saggiata in una varietà di modi tra cui, ad esempio, (1) una rappresentazione e un numero aumentati di Treg nel compartimento delle cellule T CD4<sup>+</sup>; (2)

una sovraregolazione dei CD25 dipendenti da IL-2; (3) una proliferazione aumentata, come accertato in base all'espressione del marcatore proliferativo Ki67; e (4) una frazione aumentata del sottoinsieme di Treg Klrp1<sup>+</sup> terminalmente differenziate dipendenti da IL-2. Tali effetti sulle Treg possono essere visti, ad esempio, nella milza e nel pancreas infiammato.

5            In una forma esecutiva non limitativa, le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  o loro varianti o frammenti attivi qui divulgati aumentano le Treg tollerogeniche e immunosoppressive e l'immunità aumentando le risposte delle cellule T effettrici/di memoria e, in forme esecutive ulteriori, mostrano una farmacocinetica migliorata perché forniscono tali risposte (1) a livelli efficaci più bassi di attività di IL-2 rispetto alla IL-2 nativa o ricombinante; (2) mostrando risposte biologiche più persistenti rispetto alla IL-2 nativa o ricombinante; e/o (3) preservando la gerarchia, con le Treg che rispondono a dosi più basse rispetto alle cellule T effettrici/di memoria.

10            In forme esecutive specifiche, le proteine di fusione qui divulgate hanno un'attività migliorata rispetto alla IL-2 nativa o ricombinante. Ad esempio, l'effetto delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  può aumentare le Treg tollerogeniche di circa 2 volte, 5 volte, 10 volte, 20 volte, 30 volte, 40 volte, 50 volte, 60 volte, 70 volte, 80 volte, 90 volte, 100 volte, 150 volte o 200 volte ad un livello più basso di attività di IL-2 rispetto alla IL-2 nativa o ricombinante. In altre forme esecutive, le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  qui divulgate sono più efficaci della IL-2 nativa o ricombinante nell'indurre un incremento persistente delle Treg e delle proprietà correlate.

15            Le proteine di fusione IL-2/dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  qui divulgate possono essere generate usando vari frammenti e varianti di IL-2 e IL-2R $\alpha$  di una varietà di organismi. Tali componenti sono qui discussi in ulteriore dettaglio altrove. Esempi non limitativi di proteine di fusione IL-2/dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  non processate sono riportati in SEQ ID NO:27, 36, 57 e 59, mentre esempi non limitativi di forme mature delle proteine di fusione IL-2/dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  sono riportati in SEQ ID NO:26, 37 e 62. Esempi non limitativi di polinucleotidi codificanti per tali proteine di fusione sono riportati in SEQ ID NO:33, 34, 42 e 63. Il termine "sequenza segnale secretoria" designa una sequenza polinucleotidica codificante per un polipeptide (un "peptide secretorio") che, in quanto componente di un polipeptide più grande, dirige il polipeptide più grande attraverso una via secretoria di una cellula in cui viene sintetizzato. Durante il suo transito attraverso la via secretoria, il polipeptide più grande viene comunemente

tagliato per rimuovere il peptide secretorio. Nel presente contesto, una forma "matura" di una proteina di fusione o di un polipeptide di fusione comprende la forma processata del polipeptide da cui è stato rimosso il peptide secretorio. Nel presente contesto, la forma "non processata" della proteina di fusione mantiene la sequenza del peptide secretorio. Vengono anche divulgati frammenti e varianti biologicamente attive della forma matura e della forma non processata delle proteine di fusione IL-2/dominio extracellulare di IL-R $\alpha$ , e polinucleotidi codificanti per tali frammenti e varianti. Tale polipeptide variante funzionale può comprendere un'identità di sequenza di almeno 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la sequenza riportata in SEQ ID NO:26, 27, 36, 37, 57, 59 o 62.

Vengono inoltre divulgate varianti e frammenti attivi di polinucleotidi codificanti per le proteine di fusione IL-2/dominio extracellulare di IL-R $\alpha$ . Tale polinucleotide può comprendere il polinucleotide codificante per i polipeptidi riportati in SEQ ID NO:26, 27, 36, 37, 57, 59 o 62 e continuare a codificare per proteine di fusione IL-2/dominio extracellulare di IL-R $\alpha$  che sono funzionali.

Si ravvisa inoltre che i componenti qui divulgati delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  possono essere presenti in qualsiasi ordine. In una forma esecutiva, il polipeptide di IL-2 si trova all'N-terminale e il dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  si trova al C-terminale delle proteine di fusione qui divulgate.

#### 15 i. Interleuchina-2

La proteina di fusione dell'invenzione comprende un primo polipeptide comprendente un'interleuchina-2 (IL-2); in cui il primo polipeptide ha un'identità di sequenza di almeno 70% con SEQ ID NO:2. Nel presente contesto, se non indicato altrimenti, "interleuchina-2" o "IL-2" identifica qualsiasi IL-2 nativa o ricombinante di qualsiasi vertebrato come fonte, inclusi mammiferi, come primati (ad esempio umani) e roditori (ad esempio topi e ratti), e mammiferi addomesticati o agricoli. Il termine abbraccia sia una IL-2 non processata che qualsiasi forma di IL-2 ottenuta tramite processamento nella cellula (segnatamente la forma matura di IL-2). Il termine abbraccia anche varianti e frammenti naturali di IL-2, ad esempio varianti di splicing o varianti alleliche, e varianti non naturali. La sequenza di amminoacidi di una forma matura esemplificativa della IL-2 umana (avente la sequenza segnale di 20 amminoacidi) è mostrata in SEQ ID NO:2. La IL-2 umana non processata comprende inoltre un peptide segnale N-terminale di 20 amminoacidi (SEQ ID NO:1) che è assente nella molecola della IL-2 matura. La sequenza di amminoacidi di una forma matura

esemplificativa della IL-2 murina (avente la sequenza segnale di 20 amminoacidi) è mostrata in SEQ ID NO:4. La IL-2 murina non processata comprende inoltre un peptide segnale N-terminale di 20 amminoacidi (SEQ ID NO:3) che è assente nella molecola della IL-2 matura. Vedere anche la FIG. 2A e la FIG. 2B. Con "IL-2 nativa", anche definita "IL-2 di tipo selvatico", si intende una IL-2 naturale o ricombinante.

5 Sono note sequenze di acido nucleico e sequenze di amminoacidi aggiuntive per IL-2. Vedere ad esempio i N° di accesso GenBank: Q7JFM2 (Aotus lemurinus (aoto dal ventre grigio)); Q7JFM5 (Aotus nancymaae (aoto di Nancy Ma)); P05016 (Bos taurus (toro)); Q29416 (Canis familiaris (cane) (Canis lupus familiaris)); P36835 (Capra hircus (capra)); e P37997 (Equus caballus (cavallo)).

10 Qui vengono anche divulgati frammenti e varianti biologicamente attive di IL-2. Tali varianti o frammenti attivi di IL-2 manterranno l'attività di IL-2. L'espressione "attività biologica di IL-2" identifica una o più delle attività biologiche di IL-2 tra cui, ma senza limitazioni, la capacità di stimolare i linfociti portatori di un recettore per IL-2. Tale attività può essere misurata sia in vitro che in vivo. IL-2 è un regolatore globale dell'attività immunitaria, e gli effetti qui osservati sono la sommatoria di tali attività. Ad esempio, essa regola l'attività di sopravvivenza (Bcl-2), induce l'attività effettrice delle cellule T (IFN-gamma, granzima B e perforina), e promuove l'attività regolatoria delle cellule T (FoxP3).  
15 Vedere ad esempio Malek et al. (2010) Immunity 33(2):153-65.

Sono note varianti biologicamente attive di IL-2. Vedere ad esempio le pubblicazioni di domanda US 20060269515 e US 20060160187, e WO 99/60128.

20 Le proteine di fusione qui divulgate possono impiegare frammenti e varianti biologicamente attive di IL-2. Tale frammento funzionale può comprendere un'identità di sequenza di almeno 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la sequenza riportata in SEQ ID NO:2.

Qui vengono inoltre divulgate varianti e frammenti attivi di polinucleotidi codificanti per le proteine IL-2. Tale polinucleotide funzionale può comprendere un'identità di sequenza di almeno 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con il polinucleotide codificante per la sequenza di ammino[acidi] riportata in SEQ ID NO:2, e continuare a codificare per un polipeptide di IL-2 funzionale.

25 ii. Recettore per l'interleuchina-2 alfa

La proteina di fusione dell'invenzione comprende un secondo polipeptide comprendente un dominio extracellulare di un recettore per l'interleuchina-2 alfa (IL-2R $\alpha$ ), in cui il secondo polipeptide ha un'identità di sequenza di almeno 70% con SEQ ID NO:7; che ha un'attività biologica del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ .

5 Nel presente contesto, se non indicato altrimenti, il termine "CD25" o "recettore per IL-2  $\alpha$ " o "IL-2R $\alpha$ " identifica qualsiasi IL-2R $\alpha$  nativo o ricombinante di qualsiasi vertebrato come fonte, inclusi mammiferi, come primati (ad esempio umani) e roditori (ad esempio topi e ratti), e mammiferi addomesticati o agricoli. Il termine abbraccia anche varianti naturali di IL-2R $\alpha$ , ad esempio varianti di splicing o varianti alleliche, o varianti non naturali. La IL-2 umana esercita i suoi effetti biologici segnalando attraverso il suo sistema recettoriale, IL-2R. IL-2 e il suo recettore (IL-2R) sono necessari per la proliferazione delle cellule T e per altre funzioni fondamentali che sono cruciali nella  
10 risposta immunitaria. IL-2R è costituito da 3 proteine transmembrana di tipo I, segnatamente le catene alfa (p55), beta (p75) e gamma (p65), che sono collegate in maniera non covalente. La catena alfa dell'IL-2R umano contiene un dominio extracellulare di 219 amminoacidi, un dominio transmembrana di 19 amminoacidi, e un dominio intracellulare di 13 amminoacidi. Il dominio extracellulare secreto di IL-2R alfa (IL-2R-a) può essere impiegato nelle proteine di fusione qui descritte.

15 La sequenza di amminoacidi di una forma matura esemplificativa dell'IL-2R $\alpha$  umano è mostrata in SEQ ID NO:6. L'IL-2R $\alpha$  umano non processato è mostrato in SEQ ID NO:5. Il dominio extracellulare di SEQ ID NO:6 è riportato in SEQ ID NO:7. La sequenza di amminoacidi di una forma matura esemplificativa dell'IL-2R $\alpha$  murino è mostrata in SEQ ID NO:9. L'IL-2R $\alpha$  murino non processato è mostrato in SEQ ID NO:8. Il dominio extracellulare di SEQ ID NO:9 è riportato in SEQ ID NO:10. Con "IL-2R $\alpha$  nativo", anche definito "IL-2R $\alpha$  di tipo selvatico", si intende  
20 un IL-2R $\alpha$  naturale o ricombinante. La sequenza di una molecola umana nativa di IL-2R $\alpha$  è mostrata in SEQ ID NO:5 e 6. Sono note sequenze di acido nucleico e sequenze di amminoacidi per IL-2R $\alpha$ . Vedere ad esempio i N° di accesso GenBank: NP\_001030597.1 (P. troglodytes); NP\_001028089.1 (M. mulatta); NM\_001003211.1 (C. lupus); NP\_776783.1 (B. taurus); NP\_032393.3 (M. musculus); e NP\_037295.1 (R. norvegicus).

25 Qui vengono anche divulgati frammenti e varianti biologicamente attive del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ . Tali varianti o frammenti attivi del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  manterranno l'attività del dominio extracellulare di

IL-2R $\alpha$ . L'espressione "attività biologica del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ " identifica una o più delle attività biologiche del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  tra cui, ma senza limitazioni, la capacità di potenziare la segnalazione intracellulare nelle cellule reattive ad un recettore per IL-2. Esempi non limitativi di frammenti e varianti biologicamente attive di IL-2R $\alpha$  sono divulgati, ad esempio, in Robb et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85:5654-5658, 1988. Le proteine di fusione qui divulgate possono impiegare frammenti e varianti biologicamente attive del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ . Tale variante funzionale può comprendere un'identità di sequenza di almeno 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la sequenza riportata in SEQ ID NO:7

In una forma esecutiva, le proteine di fusione qui divulgate possono comprendere almeno una mutazione all'interno del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ . In una forma esecutiva specifica, l'arginina nella posizione 35 di IL-2R $\alpha$  può essere mutata in una treonina, e/o l'arginina nella posizione 36 di IL-2R $\alpha$  può essere mutata in una serina. Tale proteina di fusione può avere un'attività di IL-2 aumentata rispetto ad una proteina di fusione che non comprende queste mutazioni nel dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , e/o rispetto alla IL-2 nativa o ricombinante. Le sequenze di amminoacidi di proteine di fusione esemplificative comprendenti un IL-2R $\alpha$  con mutazioni all'interno del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  sono riportate in SEQ ID NO:62 e 64. In una forma esecutiva, la proteina di fusione secondo l'invenzione comprende la sequenza di amminoacidi di una qualsiasi di SEQ ID NO:62; o una sequenza avente [un'identità di sequenza di] almeno 80%, 85%, 90% o 95% con SEQ ID NO:62.

Qui vengono inoltre divulgate varianti e frammenti attivi di polinucleotidi codificanti per il dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ . Tale polinucleotide funzionale può comprendere un'identità di sequenza di almeno 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con il polinucleotide codificante per la sequenza di ammino[acidi] riportata in SEQ ID NO:7, e continuare a codificare per una proteina avente l'attività del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ .

### iii. Componenti aggiuntivi

Le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  qui divulgate possono inoltre comprendere elementi aggiuntivi. Tali elementi possono favorire l'espressione della proteina di fusione, favorire la secrezione della proteina di fusione,

migliorare la stabilità della proteina di fusione, permettere una purificazione più efficiente della proteina, e/o modulare l'attività della proteina di fusione.

5 Quando riferito ad un polipeptide o polinucleotide, "eterologo" intende un polipeptide o polinucleotide che trae origine da una proteina o polinucleotide differente. I componenti aggiuntivi della proteina di fusione possono derivare dallo stesso organismo da cui derivano gli altri componenti polipeptidici della proteina di fusione, o i componenti aggiuntivi possono essere di un organismo diverso da quello da cui derivano gli altri componenti polipeptidici della proteina di fusione.

10 In una forma esecutiva, le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  qui divulgate comprendono una sequenza di raccordo situata tra il polipeptide di IL-2 e il polipeptide di IL-2R $\alpha$ . Secondo l'invenzione, il secondo polipeptide è fuso in cornice al primo polipeptide per mezzo di un raccordo, in cui la sequenza del raccordo comprende una combinazione di residui di amminoacido di glicina e serina, segnatamente, la sequenza del raccordo è GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:13) (anche annotata come (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>).

15 Raccordi alternativi che potranno essere usati, ma che non sono specificatamente rivendicati, sono un raccordo di qualsiasi lunghezza che comprende almeno 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50 o 60 o più amminoacidi; un raccordo comprendente residui di amminoacido di glicina; e raccordi di glicina/serina che possono comprendere qualsiasi combinazione dei residui di amminoacido, inclusi il peptide GGGGS o GGGGS o ripetizioni dello stesso, incluse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più ripetizioni di questi dati peptidi. Ad esempio, le sequenze di raccordo possono comprendere GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:11) (anche annotata come (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>); o (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>5</sub>; (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>6</sub>; (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>7</sub>, ecc. Le sequenze di raccordo possono inoltre  
20 comprendere (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> come riportata in SEQ ID NO:50; GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:40) (anche annotata come (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>); GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:41) (anche annotata come (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>5</sub>); (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>2</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>6</sub>; (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>7</sub>; (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>8</sub>, ecc. In aggiunta, è inoltre possibile impiegare varianti e frammenti attivi di qualsiasi raccordo.

25 Si ravvisa inoltre che il polinucleotide codificante per le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  può comprendere elementi aggiuntivi che favoriscono la traduzione della proteina di fusione. Tali sequenze comprendono, ad esempio,

sequenze di Kozak attaccate all'estremità 5' del polinucleotide codificante per la proteina di fusione. La sequenza consenso di Kozak è una sequenza incontrata nell'mRNA eucariotico che svolge un ruolo nell'inizio del processo di traduzione, e ha il consenso(gcc)gccRccAUGG (SEQ ID NO:35); in cui (1) una lettera minuscola designa la base più comune in una posizione, con la base che può comunque variare; (2) le lettere maiuscole indicano basi altamente conservate, segnatamente, la sequenza 'AUGG' è costante o cambia raramente, se non mai, con l'eccezione rappresentata dal codice di ambiguità IUPAC 'R' che indica che, in quella posizione, è usuale incontrare una purina (adenina o guanina); e (3) la sequenza tra parentesi ((gcc)) è di significato incerto. In una forma esecutiva, la sequenza di Kozak comprende la sequenza riportata in SEQ ID NO:53.

In una forma esecutiva non limitativa, le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  qui divulgate comprendono una sequenza di Kozak ottimizzata per il leader di IL-2 come riportata in SEQ ID NO:28, o una sua variante o frammento funzionale. Una variante o frammento funzionale di una sequenza di Kozak manterrà la capacità di aumentare la traduzione della proteina rispetto al livello di traduzione di una sequenza senza il leader. Tale frammento funzionale può comprendere almeno 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 nucleotidi continui di una sequenza di Kozak o della sequenza riportata in SEQ ID NO:28 o 53. In alternativa, una variante funzionale può comprendere un'identità di sequenza di almeno 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la sequenza di Kozak o con la sequenza riportata in SEQ ID NO:28 o 53.

In forme esecutive ancora ulteriori, le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  qui divulgate comprendono una o più etichette al C-terminale per favorire la purificazione del polipeptide. Tali etichette sono note e comprendono, ad esempio, un'etichetta di istidina. In forme esecutive specifiche, l'etichetta impiegata è una 6x-His. Si ravvisa inoltre la possibilità di impiegare una sequenza di raccordo aggiuntiva tra la proteina di fusione e l'etichetta di His.

Una forma esecutiva non limitativa di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  è riportata nella FIG. 1. Tale proteina di fusione comprende un peptide leader, IL-2 o una sua variante o frammento funzionale, un raccordo variabile, IL-2R $\alpha$ , un raccordo di glicina, un'etichetta 6x-His, e due codoni di terminazione.

iv. Varianti e frammenti

a. Polinucleotidi

Nei vari metodi e composizioni qui divulgate, è possibile impiegare frammenti e varianti dei polinucleotidi codificanti per le proteine di fusione IL-2/dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  o per i vari componenti in esse contenuti (vale a dire il dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , i polipeptidi di IL-2R $\alpha$ , le sequenze di raccordo e/o le sequenze di Kozak). Con "frammento" si intende una porzione del polinucleotide, e dunque della proteina codificata dallo stesso, o una porzione del polipeptide. I frammenti di un polinucleotide potranno codificare per frammenti proteici che mantengono l'attività biologica della proteina nativa e dunque hanno un'attività di IL-2, un'attività del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , un'attività della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  o, se codificano per una sequenza di raccordo, che forniscono l'attività desiderata delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ .

Una porzione biologicamente attiva di un dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , di un polipeptide di IL-2, di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ , di una sequenza di Kozak o di una sequenza di raccordo può essere preparata isolando una porzione di uno dei polinucleotidi codificanti per la porzione del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  o del polipeptide di IL-2, ed esprimendo la porzione codificata del polipeptide (ad esempio tramite espressione ricombinante in vitro) e accertando l'attività della porzione del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  e/o del polipeptide di IL-2 o l'attività delle proteine di fusione IL-2/IL-R $\alpha$ .

Le sequenze "varianti" hanno un alto grado di somiglianza di sequenza. Per i polinucleotidi, le varianti conservative comprendono quelle sequenze che, a causa della degenerazione del codice genetico, codificano per la sequenza di amminoacidi di uno tra il polipeptide del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , il polipeptide di IL-2, la proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  o la sequenza di raccordo. Le varianti di questo tipo possono essere identificate con l'uso di tecniche di biologia molecolare ben note come, ad esempio, le tecniche di reazione a catena della polimerasi (PCR) e le tecniche di ibridazione. I polinucleotidi varianti comprendono anche sequenze di nucleotidi di derivazione sintetica, come quelle generate, ad esempio, usando la mutagenesi sito-diretta, che continuano comunque a codificare per un dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , un polipeptide di IL-2, una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ , una sequenza di Kozak o la sequenza di un raccordo.

#### b. Polipeptidi

Con proteina "variante" si intende una proteina derivata dalla proteina nativa tramite delezione (il cosiddetto troncamento) o addizione di uno o più amminoacidi all'estremità N-terminale e/o C-terminale della proteina nativa; tramite delezione o addizione di uno o più amminoacidi in uno o più siti della proteina nativa; o tramite sostituzione di uno o più amminoacidi in uno o più siti della proteina nativa. Le proteine varianti sono biologicamente attive, nel senso che continuano a possedere l'attività biologica desiderata, ovvero l'attività della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ , l'attività di IL-2 o l'attività del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ . Tali varianti potranno essere, ad esempio, il risultato di un polimorfismo genetico o di una manipolazione umana. Le varianti biologicamente attive di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  o di uno qualsiasi dei suoi componenti (ovvero un polipeptide di dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , un polipeptide di IL-2 o una sequenza di raccordo) avranno un'identità di sequenza di almeno circa 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più con la sequenza di amminoacidi della proteina nativa, come determinato usando i programmi di allineamento di sequenze e i parametri qui descritti altrove. Una variante biologicamente attiva di una proteina potrà divergere da quella proteina anche solo per 1-15 amminoacidi, anche solo per 1-10, come per 6-10, anche solo per 5, o anche solo per 4, 3, 2 o persino 1 residuo di amminoacido.

Le proteine potranno essere alterate in vari modi, incluso tramite sostituzioni, delezioni, troncamenti e inserzioni di amminoacido. I metodi per tali manipolazioni sono generalmente noti nel ramo. Ad esempio, le sequenze di amminoacidi varianti del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , del polipeptide di IL-2, della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  o delle sequenze di raccordo possono essere preparate attraverso mutazioni nel DNA. Nel ramo sono ben noti metodi di mutagenesi e metodi per alterare le sequenze di nucleotidi. Vedere ad esempio Kunkel (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; brevetto US 4.873.192; Techniques in Molecular Biology, redattori Walker e Gaastra (1983) (MacMillan Publishing Company, New York), e i riferimenti citati al suo interno. Per una guida alle sostituzioni di amminoacido appropriate che non influenzano l'attività biologica della proteina d'interesse, sarà possibile fare riferimento al modello di Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Nat'l Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Potranno essere preferibili le sostituzioni conservative, come quelle in cui un amminoacido viene scambiato con un altro avente proprietà simili.

I polinucleotidi qui divulgati possono dunque comprendere le sequenze naturali, le sequenze "native", e anche forme mutanti. Analogamente, le proteine usate nei metodi qui divulgati abbracciano le proteine naturali e anche loro varianti e forme modificate. Tali varianti continueranno a possedere la capacità di implementare un evento di ricombinazione. In generale, le mutazioni apportate nel polinucleotide codificante per il polipeptide variante non dovranno mettere la sequenza fuori dalla cornice di lettura, e/o non dovranno creare regioni complementari che potrebbero produrre una struttura di mRNA secondaria. Vedere la pubblicazione di domanda di brevetto EP 75.444.

I polinucleotidi e le proteine varianti abbracciano anche sequenze e proteine derivate da una procedura mutagenica o ricombinogenica, come il rimescolamento del DNA. Tale procedura permette di manipolare una o più sequenze codificanti per domini extracellulari di IL-2R $\alpha$  o per IL-2 differenti allo scopo di creare nuovi domini extracellulari di IL-2R $\alpha$  o nuovi polipeptidi di IL-2 in possesso delle proprietà desiderate. In questo modo, usando una popolazione di polinucleotidi con sequenze correlate che comprendono regioni di sequenza aventi un'identità di sequenza sostanziale e che possono essere sottoposte a ricombinazione omologa in vitro o in vivo, vengono generate librerie di polinucleotidi ricombinanti. Nel ramo sono note strategie per effettuare tale rimescolamento del DNA. Vedere ad esempio Stemmer (1994) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; e brevetti US 5.605.793 e US 5.837.458.

### III. Polinucleotidi codificanti per le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ , e metodi di loro produzione

Le composizioni qui divulgate comprendono inoltre polinucleotidi isolati che codificano per le varie proteine di fusione descritte qui sopra e per loro varianti e frammenti. Vengono inoltre divulgati vettori e cassette di espressione che comprendono i polinucleotidi qui divulgati. Le cassette di espressione comprenderanno generalmente un promotore operativamente collegato ad un polinucleotide e ad una regione di terminazione della trascrizione e della traduzione.

L'uso del termine "polinucleotide" non intende limitare la presente invenzione ai polinucleotidi comprendenti DNA. Le persone di competenza ordinaria nel ramo ravviseranno che i polinucleotidi possono comprendere

ribonucleotidi, e combinazioni di ribonucleotidi e desossiribonucleotidi. Tali desossiribonucleotidi e ribonucleotidi comprendono sia molecole naturali che analoghi sintetici.

5 Un polinucleotide o una proteina "isolata" o "purificata", o una sua porzione biologicamente attiva, è sostanzialmente o essenzialmente libera da componenti che, normalmente, accompagnano o interagiscono con il polinucleotide o la proteina nel suo ambiente naturale. Un polinucleotide o una proteina isolata o purificata è dunque sostanzialmente libera da altro materiale cellulare o dal terreno di coltura quando prodotta con tecniche ricombinanti, o è sostanzialmente libera da precursori chimici o altre sostanze chimiche quando sintetizzata chimicamente. Nello scenario ottimale, un polinucleotide "isolato" è libero da sequenze (idealmente sequenze codificanti per proteine) che, in natura, fiancheggiano il polinucleotide (segnatamente le sequenze situate alle estremità 5' e 3' del polinucleotide) nel DNA genomico dell'organismo da cui il polinucleotide deriva. Ad esempio, in varie forme esecutive, il polinucleotide isolato può contenere meno di circa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb di sequenze di nucleotidi che, in natura, fiancheggiano il polinucleotide nel DNA genomico della cellula da cui il polinucleotide deriva. Una proteina che è sostanzialmente libera da materiale cellulare comprende preparati della proteina che hanno meno di circa 30%, 20%, 10%, 5% o 1% (in peso secco) di proteine contaminanti. Quando la proteina dell'invenzione o una sua porzione biologicamente attiva viene prodotta tramite ricombinazione, il terreno di coltura rappresenta idealmente meno di circa 30%, 20%, 10%, 5% o 1% (in peso secco) in termini di precursori chimici o di sostanze chimiche diverse dalla proteina d'interesse.

20 Qui sarà possibile impiegare tecniche convenzionali di biologia molecolare, microbiologia e DNA ricombinante che rientrano nelle conoscenze del ramo. Tali tecniche sono esaustivamente spiegate nella letteratura. Vedere ad esempio Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumi I-III [redattore Ausubel, R. M. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumi I-III [redattore J. E. Celis (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumi I-III [redattore Coligan, J. E. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (redattore M. J. Gait, 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [reattori B. D. Hames & S. J. Higgins (1985)]; "Transcription And Translation" [redattori B. D. Hames & S. J. Higgins (1984)]; "Animal Cell

Culture" [redattore R. I. Freshney (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

5 Qui viene anche divulgato un vettore che comprende i polinucleotidi descritti sopra operativamente collegati ad un promotore. Una sequenza di nucleotidi è "operativamente collegata" ad una sequenza di controllo dell'espressione (ad esempio un promotore) quando la sequenza di controllo dell'espressione controlla e regola la trascrizione e la traduzione di quella sequenza. Quando riferito ad una sequenza di nucleotidi, il termine "operativamente collegata" comprende il fatto che la sequenza ha un segnale di inizio appropriato (ad esempio ATG) di fronte alla sequenza di nucleotidi da esprimere, e mantiene la cornice di lettura corretta che permette di esprimere la sequenza sotto il controllo della sequenza di controllo dell'espressione e produrre il prodotto desiderato che è codificato dalla sequenza. Se un gene  
10 che si desidera inserire in una molecola di acido nucleico ricombinante non contiene un segnale di inizio appropriato, tale segnale di inizio può essere inserito di fronte al gene. Un "vettore" è un replicone, come un plasmide, un fago o un cosmide, a cui sarà possibile attaccare un altro segmento di acido nucleico allo scopo di ottenere la replicazione del segmento attaccato. Il promotore potrà essere, o potrà essere identico a, un promotore di batterio, lievito, insetto o mammifero. Inoltre, il vettore potrà essere un plasmide, un cosmide, un cromosoma artificiale di lievito (YAC), un  
15 batteriofago, o un DNA virale eucariotico.

Sarà possibile impiegare altri numerosi scheletri di vettore che sono noti nel ramo come utili per l'espressione di una proteina. Tali vettori comprendono, ma senza limitazioni: adenovirus, virus delle scimmie 40 (SV40), citomegalovirus (CMV), virus del tumore mammario murino (MMTV), virus della leucemia murina di Moloney, sistemi di rilascio del DNA, ad esempio liposomi e sistemi di rilascio per plasmidi di espressione. Inoltre, una classe di  
20 vettori comprende elementi di DNA derivati da virus come papillomavirus bovino, polyomavirus, baculovirus, retrovirus, o virus della foresta di Semliki. Tali vettori potranno essere ottenuti in commercio, o potranno essere assemblati dalle sequenze descritte con metodi ben noti nel ramo.

Qui viene divulgato un sistema ospite/vettore per la produzione di un polipeptide che comprende il vettore in una cellula ospite adatta. Le cellule ospiti adatte comprendono, ma senza limitazioni, cellule procariotiche o  
25 eucariotiche, ad esempio cellule di batterio (incluse le cellule Gram-positive), cellule di lievito, cellule di fungo, cellule

di insetto e cellule di animale. Come ospiti, sarà possibile usare numerose cellule di mammifero tra cui, ma senza limitazioni, le cellule fibroblastiche murine NIH 3T3, le cellule CHO, le cellule HeLa, le cellule Ltk<sup>-</sup>, ecc. È anche possibile usare altre cellule di animale, come le cellule R1.1, BW e LM, le cellule di rene di cercopiteco grigioverde (ad esempio COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 e BMT10), cellule di insetto (ad esempio Sf9), e cellule umane e cellule di  
5 pianta in coltura tissutale.

Per esprimere le sequenze polinucleotidiche qui presentate, sarà possibile impiegare un'ampia varietà di combinazioni ospite/vettore di espressione. Ad esempio, i vettori di espressione utili potranno essere costituiti da segmenti di sequenze di DNA cromosomico, non cromosomico e sintetico. I vettori adatti comprendono derivati di SV40 e plasmidi batterici noti, ad esempio i plasmidi di *E. coli* colE1, pCR1, pBR322, pMB9 e loro derivati, plasmidi  
10 come RP4; DNA fagici, ad esempio i numerosi derivati del fago  $\lambda$ , ad esempio NM989, e altri DNA fagici, ad esempio il DNA di M13 e i DNA di fagi filamentosi a filamento singolo; plasmidi di lievito, come il plasmide  $2\mu$  o suoi derivati; vettori utili nelle cellule eucariotiche, come vettori utili in cellule di insetto o mammifero; vettori derivati da combinazioni di plasmidi e DNA fagici, come plasmidi che sono stati modificati per impiegare un DNA fagico o altre sequenze di controllo dell'espressione; e simili.

Per esprimere le sequenze polinucleotidiche qui fornite, questi vettori potranno adoperare una qualsiasi di un'ampia varietà di sequenze di controllo dell'espressione (sequenze che controllano l'espressione di una sequenza di nucleotidi operativamente collegata ad esse). Tali sequenze di controllo dell'espressione utili comprendono, ad esempio, i promotori precoci o tardivi di SV40, CMV, vaccinia virus, polyomavirus o adenovirus, il sistema lac, il sistema trp, il sistema TAC, il sistema TRC, il sistema LTR, le regioni di operatore maggiore e promotore del fago  $\lambda$ , le regioni di  
20 controllo della proteina di rivestimento fd, il promotore della 3-fosfoglicerato chinasi o di altri enzimi glicolitici, i promotori della fosfatasi acida (ad esempio PhoS), i promotori dei fattori di accoppiamento  $\alpha$  del lievito, e altre sequenze note che controllano l'espressione di geni di cellule procariotiche o eucariotiche o di loro virus, e varie loro combinazioni.

Resterà inteso che non tutti i vettori, le sequenze di controllo dell'espressione e gli ospiti funzioneranno ugualmente bene nell'esprimere le sequenze polinucleotidiche qui fornite. Né tutti gli ospiti funzioneranno ugualmente  
25

bene con lo stesso sistema di espressione. Tuttavia, un esperto nel ramo sarà in grado di selezionare i vettori, le sequenze di controllo dell'espressione e gli ospiti idonei senza indebita sperimentazione, allo scopo di ottenere l'espressione desiderata senza allontanarsi dall'ambito di questa invenzione. Ad esempio, durante la selezione di un vettore, è necessario tenere conto dell'ospite, perché è nell'ospite che il vettore deve funzionare. Altri fattori da tenere a mente saranno il numero di copie del vettore, la capacità di controllare quel numero di copie, e l'espressione di qualsiasi altra proteina codificata dal vettore, come marcatori antibiotici.

5  
10  
15  
20  
25

Durante la selezione di una sequenza di controllo dell'espressione, verrà normalmente considerata una varietà di fattori. Questi comprendono, ad esempio, la forza relativa del sistema, la capacità di controllarlo, e la sua compatibilità con la particolare sequenza di nucleotidi o con il particolare gene da esprimere, specie con riferimento alle strutture secondarie potenziali. Gli ospiti unicellulari adatti saranno selezionati prendendo in considerazione, ad esempio, la loro compatibilità con il vettore scelto, le loro caratteristiche di secrezione, la loro capacità di ripiegare correttamente le proteine e i loro requisiti di fermentazione, come anche la tossicità per l'ospite del prodotto codificato dalle sequenze di nucleotidi da esprimere, e la facilità di purificazione dei prodotti dell'espressione.

15  
20  
25

Durante la preparazione della cassetta d'espressione, i vari polinucleotidi potranno essere manipolati allo scopo di fornire le sequenze di polinucleotidi nell'orientamento idoneo e, eventualmente, nella cornice di lettura appropriata. A questo scopo, sarà possibile adoperare adattatori o raccordi per unire i polinucleotidi, o sarà possibile prevedere altre manipolazioni per ottenere siti di restrizione convenienti, la rimozione del DNA superfluo, la rimozione dei siti di restrizione, o simili. Ad esempio, sarà possibile aggiungere raccordi tra i polipeptidi, come due glicine. Sarà possibile aggiungere residui di metionina, codificati dalle sequenze di nucleotidi atg, per permettere l'inizio della trascrizione del gene. A questo proposito, sarà possibile prevedere una mutagenesi in vitro, una riparazione basata su primer, una restrizione, un appaiamento, e risostituzioni, ad esempio transizioni e transversioni.

25

Viene inoltre fornito un metodo di produzione di un polipeptide che prevede di esprimere un polinucleotide codificante per una proteina di fusione qui divulgata in una cellula ospite in condizioni adatte che permettono la produzione del polipeptide, e recuperare il polipeptide così prodotto; in cui il polipeptide è la proteina di fusione secondo l'invenzione.

#### IV. Proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ per l'uso in metodi

Vengono divulgati vari metodi per modulare una risposta immunitaria. Nel presente contesto, il termine "modulare" comprende indurre, inibire, accrescere, elevare, aumentare o diminuire una data attività o risposta.

5 Con "soggetto" si intendono mammiferi, ad esempio primati, umani, animali agricoli e addomesticati come, ma senza limitazioni, cani, gatti, bovini, cavalli, maiali, pecore e simili. In una forma esecutiva, il soggetto sottoposto a trattamento con le formulazioni farmaceutiche qui divulgate è un umano.

10 Con "quantità terapeuticamente efficace" di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  si intende la quantità della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  che è sufficiente per suscitare la risposta biologica desiderata. Come apprezzerà una persona di competenza ordinaria nel ramo, la quantità assoluta efficace di una particolare proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  può variare a seconda di fattori come l'endpoint biologico desiderato, le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  da somministrare, la cellula o il tessuto bersaglio, e simili. Una persona di competenza ordinaria nel ramo saprà inoltre che una quantità efficace può essere somministrata in una dose singola, o può essere ottenuta attraverso la somministrazione di molteplici dosi (ad esempio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più dosi).

##### i. Proteina di fusione per l'uso in un metodo per aumentare una risposta immunitaria

15 Vengono divulgati vari metodi per aumentare la risposta immunitaria in un soggetto. Tali metodi prevedono di somministrare, ad un soggetto bisognoso di aumentare la risposta immunitaria, una quantità terapeuticamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . In questo caso, in forme esecutive specifiche, l'applicazione transitoria di dosi più alte di IL-2 serve a rafforzare la risposta immunitaria effettrice e quella di memoria.

20 Si ravvisa inoltre che le varie proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  possono essere usate in combinazione con un antigene per potenziare la risposta immunitaria all'antigene. Le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  possono dunque essere anche usate come adiuvanti per vaccini, specie per rafforzare la memoria immunitaria cellulo-mediata.

25 Ad esempio, la proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  secondo l'invenzione può essere usata per potenziare un preparato vaccinale. Le varie proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  sono dunque utili per aumentare l'efficacia dei vaccini anticancro o dei vaccini che sono scarsamente immunogenici. Inoltre, la proteina di fusione dell'invenzione può essere usata in un metodo per potenziare l'efficacia o l'immunogenicità di un vaccino in un soggetto, o per superare una

risposta immunitaria soppressa ad un vaccino in un soggetto, che prevede di (i) somministrare una quantità terapeutamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  al soggetto, e (ii) somministrare un vaccino al soggetto.

5 Con "vaccino" si intende una composizione utile per stimolare una risposta immunitaria (o risposta immunogenica) specifica in un soggetto. In alcune forme esecutive, la risposta immunogenica è protettiva o fornisce un'immunità protettiva. Ad esempio, nel caso di un organismo causativo di una malattia, il vaccino permette al soggetto di resistere meglio all'infezione da o alla progressione della malattia causata dall'organismo contro cui il vaccino è diretto. In alternativa, nel caso di un cancro, il vaccino rafforza le difese naturali del soggetto contro tumori già sviluppati. Questi tipi di vaccini potranno anche prevenire l'ulteriore crescita di tumori esistenti, prevenire la recidiva di tumori trattati, e/o eliminare le cellule cancerose che non sono state uccise da trattamenti pregressi.

10 I vaccini rappresentativi comprendono, ma senza limitazioni, vaccini contro difterite, tetano, pertosse, poliomielite, morbillo, parotite, rosolia, epatite B, Haemophilus influenzae di tipo b, varicella, meningite, virus dell'immunodeficienza umana, tubercolosi, virus di Epstein-Barr, malaria, epatite E, dengue, rotavirus, herpes, papillomavirus umano, e tumori. I vaccini d'interesse comprendono i due vaccini autorizzati dalla Food & Drug Administration statunitense per prevenire le infezioni virali che possono portare a cancro: il vaccino contro l'epatite B, che previene l'infezione dal virus dell'epatite B, un agente infettivo associato al cancro del fegato (MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 46:107-09, 1997); e Gardasil<sup>TM</sup>, che previene l'infezione da due tipi di papillomavirus umano che, collettivamente, sono responsabili del 70 per cento dei casi di cancro della cervice in tutto il mondo (Speck e Tying, Skin Therapy Lett. 11:1-3, 2006). Altri vaccini di trattamento d'interesse comprendono vaccini terapeutici per il  
15 trattamento di cancro, cancro della cervice, linfoma non-Hodgkin a cellule B follicolari, cancro del rene, melanoma cutaneo, melanoma oculare, cancro alla prostata e mieloma multiplo. Con "potenziare l'efficacia" o potenziare l'immunogenicità" in relazione ad un vaccino si intende migliorare un esito, ad esempio come misurato in base ad un cambiamento di uno specifico valore, come un aumento o una diminuzione di un particolare parametro di un'attività di un vaccino che è associata ad un'immunità protettiva. In una forma esecutiva, il potenziamento identifica un aumento di  
20 almeno 5%, 10%, 25%, 50%, 100% o più di 100% di un parametro particolare. In un'altra forma esecutiva, il

potenziamento identifica una diminuzione di almeno 5%, 10%, 25%, 50%, 100% o più di 100% di un parametro particolare. In un esempio, il potenziamento dell'efficacia/immunogenicità di un vaccino identifica un aumento della capacità del vaccino di inibire o trattare la progressione di una malattia, come un aumento dell'efficacia del vaccino di almeno 5%, 10%, 25%, 50%, 100% o più di 100% a tale scopo. In un esempio ulteriore, il potenziamento dell'efficacia/immunogenicità di un vaccino identifica un aumento della capacità del vaccino di reclutare le difese naturali del soggetto contro tumori già sviluppati, come un aumento dell'efficacia del vaccino di almeno 5%, 10%, 25%, 50%, 100% o più di 100% a tale scopo.

In analogia, con "superare una risposta immunitaria soppressa" in relazione ad un vaccino si intende migliorare un esito, ad esempio come misurato in base ad un cambiamento di uno specifico valore, come il ritorno ad un valore precedentemente positivo di un particolare parametro di un'attività di un vaccino che è associata ad un'immunità protettiva. In una forma esecutiva, il superamento identifica un aumento di almeno 5%, 10%, 25%, 50%, 100% o più di 100% di un parametro particolare. In un esempio, il superamento di una risposta immunitaria soppressa ad un vaccino identifica una rinnovata capacità del vaccino di inibire o trattare la progressione di una malattia, come un rinnovamento dell'efficacia del vaccino di almeno 5%, 10%, 25%, 50%, 100% o più di 100% a tale scopo. In un esempio ulteriore, il superamento di una risposta immunitaria soppressa ad un vaccino identifica una rinnovata capacità del vaccino di reclutare le difese naturali del soggetto contro tumori già sviluppati, come un rinnovamento dell'efficacia del vaccino di almeno 25%, 50%, 100% o più di 100% a tale scopo. Con "quantità terapeutamente efficace" si intende una quantità che è utile nel trattamento, nella prevenzione o nella diagnosi di una malattia o condizione. Nel presente contesto, una quantità terapeutamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  è una quantità che, quando somministrata ad un soggetto, è sufficiente per ottenere un effetto desiderato, come modulare una risposta immunitaria in un soggetto senza causare un effetto citotossico sostanziale nel soggetto. Come delineato sopra, una quantità terapeutamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  può essere somministrata ad un soggetto per aumentare una risposta immunitaria, potenziare la risposta immunitaria ad un antigene, aumentare l'efficacia o l'immunogenicità di un vaccino in un soggetto, o superare una risposta immunitaria soppressa ad un vaccino. La quantità efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  che è utile per modulare tali funzioni dipenderà dal soggetto trattato, dalla severità dell'affezione, e

dalla modalità di somministrazione delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . Le dosi esemplificative comprendono da circa 10<sup>4</sup> a circa 10<sup>7</sup> IU di attività di IL-2 per adulto, da circa 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2 per adulto, da circa 10<sup>5</sup> a circa 10<sup>6</sup> IU di attività di IL-2 per adulto, da circa 10<sup>6</sup> a circa 10<sup>7</sup> IU di attività di IL-2 per adulto. In altri casi, la dose terapeuticamente efficace delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  è circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  100 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  10 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  2 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  20 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  30 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  40 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  50 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  60 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  70 volte, circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  80 volte, o circa 10<sup>5</sup> IU di attività di IL-2  $\pm$  90 volte. In una specifica forma esecutiva non limitativa, una proteina di fusione IL-2 umana viene somministrata a questo dosaggio.

10 In una forma esecutiva, lo standard di riferimento per la proteina di fusione a IL-2 murina è la IL-2 murina di eBioscience (numero catalogo: 14-8021). In breve, la bioattività della IL-2 murina di eBioscience è la seguente: La ED<sub>50</sub> di questa proteina, misurata con il saggio di proliferazione delle cellule CTLL-2, è inferiore o uguale a 175 pg/mL. Ciò corrisponde ad un'attività specifica che è superiore o uguale a 5,7 x 10<sup>6</sup> Unità/mg.

15 In un'altra forma esecutiva, lo standard di riferimento per la proteina di fusione a IL-2 umana è il farmaco a base di IL-2 umana aldesleuchina (Proleukin). Segnatamente, le proteine di fusione IL-2 qui divulgate vengono direttamente confrontate con il farmaco a base di IL-2 che viene usato nella terapia con IL-2 a bassa dose o alta dose. L'attività di IL-2 per la IL-2 murina e per quella umana viene saggiata adoperando lo stesso saggio, e le attività di queste due IL-2 sono simili quando espresse in unità/mg. Con riferimento al farmaco a base di IL-2 umana, segnatamente l'aldesleuchina (Proleukin), la misura standard per una quantità di IL-2 è l'Unità internazionale (IU) che, tecnicamente, non è una quantità fissa bensì la quantità che produce un effetto fisso in uno specifico saggio dell'attività biologica, segnatamente nel saggio di proliferazione di CTLL. Nella pratica, la produzione di IL-2 è standardizzata, ed esiste una conversione tra il peso del farmaco e le Unità internazionali. Questa conversione è 1,1 mg di IL-2 = 18 milioni IU (abbreviato 18 MIU).

20 Resta inoltre inteso che le dosi appropriate di un agente funzionale dipendono dalla potenza dell'agente attivo in relazione all'attività da modulare. Tali dosi appropriate potranno essere determinate usando i saggi qui descritti.

Inoltre, resta inteso che lo specifico livello di dose per un qualsiasi soggetto animale particolare dipenderà da una varietà di fattori, tra cui attività dello specifico composto impiegato, età, peso corporeo, stato di salute generale, sesso e dieta del soggetto, tempo di somministrazione, via di somministrazione, tasso di escrezione, e/o eventuali combinazioni di farmaci.

5           Quando la somministrazione è a scopo di trattamento, la somministrazione potrà essere a scopo profilattico o a scopo terapeutico. Quando fornita a scopo profilattico, la sostanza viene fornita in anticipo rispetto a qualsiasi sintomo. La somministrazione profilattica della sostanza serve a prevenire o attenuare qualsiasi sintomo successivo. Quando fornita a scopo terapeutico, la sostanza viene somministrata all'esordio (o poco dopo l'esordio) di un sintomo. La somministrazione terapeutica della sostanza serve ad attenuare qualsiasi sintomo esistente.

10           Il tecnico esperto saprà che certi fattori potranno influenzare il dosaggio richiesto per trattare efficacemente un soggetto tra cui, ma senza limitazioni, la severità della malattia o del disturbo, i trattamenti pregressi, lo stato di salute generale e/o l'età del soggetto, e la presenza di altre malattie. Inoltre, il trattamento di un soggetto con una quantità terapeuticamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  può comprendere un trattamento singolo o, preferibilmente, può comprendere una serie di trattamenti. Si apprezzerà inoltre che il dosaggio efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  usata a scopo di trattamento potrà aumentare o diminuire nel corso di un particolare trattamento.

15           Il dosaggio potrà essere passibile di cambiamenti che risulteranno evidenti in base ai risultati di saggi diagnostici come qui descritti.

          Le quantità terapeuticamente efficaci di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  possono essere determinate con studi su animali. Usando i saggi su animali, il dosaggio somministrato sarà un dosaggio che fornisce una concentrazione in vivo bersaglio simile a quella dimostratasi efficace nei saggi su animali.

20           

ii. Proteina di fusione per l'uso in un metodo per ridurre una risposta immunitaria

          L'invenzione comprende inoltre una proteina di fusione secondo la presente invenzione per l'uso nel diminuire la risposta immunitaria in un soggetto. Vengono divulgati vari metodi per diminuire la risposta immunitaria in un soggetto. Tali metodi prevedono di somministrare, ad un soggetto bisognoso di diminuire la risposta immunitaria, una

25           quantità terapeuticamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ .

Esiste un grande interesse nella possibilità di sfruttare il potere soppressivo delle Treg per inibire le risposte immunitarie indesiderate. I dati sui topi e sugli umani mostrano che, potenziando la segnalazione di IL-2R con una bassa dose di IL-2, è possibile rafforzare selettivamente le Treg e potenziare i meccanismi di tollerogenicità immunitaria. Le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  qui divulgate rappresentano una forma nuova e migliorata di IL-2 che potenzia le Treg in misura maggiore. Le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  possono dunque essere somministrate a pazienti con malattie autoimmuni, malattia cronica dell'innesto contro l'ospite, reazioni di rigetto del trapianto, e altre condizioni dove l'obiettivo è sopprimere la reattività self.

Ad esempio, una quantità terapeuticamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  che promuove la tolleranza immunitaria può trovare uso, ad esempio, nel trattamento di un soggetto avente un disturbo autoimmune o infiammatorio tra cui, ma senza limitazioni, rigetti di innesto e allergie. Pertanto, in una forma esecutiva, viene fornita una proteina di fusione secondo l'invenzione per l'uso in un metodo di trattamento di un soggetto avente un disturbo autoimmune o infiammatorio. Tale metodo prevede di somministrare una quantità terapeuticamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  al soggetto.

Esempi non limitativi di disturbi autoimmuni che possono essere trattati o prevenuti comprendono diabete di tipo 1, sclerosi multipla, artrite reumatoide, celiachia, lupus eritematoso sistemico, artrite idiopatica giovanile, morbo di Crohn, colite ulcerosa o sclerosi sistemica, malattia dell'innesto contro l'ospite, vasculite indotta da HCV, alopecia areata o psoriasi.

Disturbi autoimmuni aggiuntivi comprendono quelli che presentano già un'indicazione di possibile compromissione delle Treg e che potrebbero trarre beneficio da un rafforzamento IL-2-dipendente delle Treg. A questo proposito, i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in IL-2, IL-2R $\alpha$  o IL-2R13 sono stati associati ad un rischio genetico di diabete di tipo 1, sclerosi multipla, artrite reumatoide, celiachia, lupus eritematoso sistemico, artrite idiopatica giovanile, morbo di Crohn, colite ulcerosa e sclerosi sistemica. Studi suggeriscono che il rischio genetico è correlato ad una compromissione delle Treg in termini di numero e/o attività. In aggiunta, è stato mostrato che una terapia a base di IL-2 a bassa dose apporta benefici nei pazienti con GvHD cronica e vasculite indotta da HCV.

Pertanto, anche tali popolazioni di pazienti possono ricevere in somministrazione una quantità terapeuticamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ .

5 In altre forme esecutive, le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  come divulgate possono essere usate in combinazione con un agente terapeutico per ridurre la risposta immunitaria ad un agente (ad esempio una proteina). Ad esempio, le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  come divulgate possono essere usate in combinazione con una proteina terapeutica che deve essere somministrata cronicamente ad un soggetto. Pertanto, in una forma esecutiva specifica, il metodo prevede di somministrare al soggetto almeno un agente terapeutico aggiuntivo in combinazione con una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . Tali agenti terapeutici comprendono, ma senza limitazioni, una citochina, un glucocorticoide, un'antraciclina (ad esempio doxorubicina o epirubicina), un fluorochinolone (ad esempio ciprofloxacina), un antifolato (ad esempio metotrexato), un antimetabolita (ad esempio fluorouracile), un inibitore di topoisomerasi (ad esempio camptotecina, irinotecan o etoposide), un agente alchilante (ad esempio ciclofosfamide, ifosfamide, mitolattolo o melfalan), un antiandrogeno (ad esempio flutamide), un antiestrogeno (ad esempio tamoxifene), un composto a base di platino (ad esempio cisplatino), un alcaloide della vinca (ad esempio vinorelbina, vinblastina o vindesina) o un inibitore mitotico (ad esempio paclitaxel o docetaxel).

15 Inoltre, la quantità terapeuticamente efficace delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  come divulgate può essere ulteriormente somministrata in terapie di combinazione per aumentare le Treg e la tolleranza. Tali terapie di combinazione possono comprendere la quantità terapeuticamente efficace delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  in combinazione con un anti-TNF $\alpha$  o con altri agenti che inibiscono le risposte infiammatorie. La quantità terapeuticamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  che è utile per diminuire una risposta immunitaria dipenderà dal soggetto trattato, dalla severità dell'affezione, e dalla modalità di somministrazione delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . Le dosi esemplificative comprendono da circa  $10^3$  IU a circa  $10^6$  IU di attività di IL-2 per adulto o da circa  $10^4$  IU a circa  $10^6$  IU di attività di IL-2 per adulto. Le dosi esemplificative comprendono da circa  $10^3$  a circa  $10^6$  IU di attività di IL-2 per adulto, da circa  $10^3$  a circa  $10^4$  IU di attività di IL-2 per adulto, da circa  $10^4$  a circa  $10^6$  IU di attività di IL-2 per adulto, da circa  $10^4$  a  $10^5$  IU di attività di IL-2 per adulto, o da circa  $10^5$  a circa  $10^6$  IU di attività di IL-2 per adulto. In altri casi, la dose terapeuticamente efficace delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  è circa  $10^4$  IU di

attività di IL-2  $\pm$  100 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  10 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  2 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  20 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  30 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  40 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  50 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  60 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  70 volte, circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  80 volte, o circa  $10^4$  IU di attività di IL-2  $\pm$  90 volte. In una specifica forma  
5 esecutiva non limitativa, una proteina di fusione IL-2 umana viene somministrata a questo dosaggio.

In una forma esecutiva, lo standard di riferimento per la proteina di fusione a IL-2 murina è la IL-2 murina di eBioscience (numero catalogo: 14-8021). In breve, la bioattività della IL-2 murina di eBioscience è la seguente: La  $ED_{50}$  di questa proteina, misurata con il saggio di proliferazione delle cellule CTLL-2, è inferiore o uguale a 175 pg/mL. Ciò corrisponde ad un'attività specifica che è superiore o uguale a  $5,7 \times 10^6$  Unità/mg.

10 In un'altra forma esecutiva, lo standard di riferimento per la proteina di fusione a IL-2 umana è il farmaco a base di IL-2 umana aldesleuchina (Proleukin). Segnatamente, le proteine di fusione IL-2 qui divulgate vengono direttamente confrontate con il farmaco a base di IL-2 che viene usato nella terapia con IL-2 a bassa dose o alta dose. L'attività di IL-2 per la IL-2 murina e per quella umana viene saggiata adoperando lo stesso saggio, e le attività di  
15 queste due IL-2 sono simili quando espresse in unità/mg. Con riferimento al farmaco a base di IL-2 umana, segnatamente l'aldesleuchina (Proleukin), la misura standard per una quantità di IL-2 è l'Unità internazionale (IU) che, tecnicamente, non è una quantità fissa bensì la quantità che produce un effetto fisso in uno specifico saggio dell'attività biologica, segnatamente nel saggio di proliferazione di CTLL. Nella pratica, la produzione di IL-2 è standardizzata, ed esiste una conversione tra il peso del farmaco e le Unità internazionali. Questa conversione è  $1,1 \text{ mg di IL-2} = 18$  milioni IU (abbreviato 18 MIU).

20 Resta inoltre inteso che le dosi appropriate di un agente funzionale dipendono dalla potenza dell'agente attivo in relazione all'espressione o attività da modulare. Tali dosi appropriate potranno essere determinate usando i saggi qui descritti. Inoltre, resta inteso che lo specifico livello di dose per un qualsiasi soggetto animale particolare dipenderà da una varietà di fattori, tra cui attività dello specifico composto impiegato, età, peso corporeo, stato di salute generale, sesso e dieta del soggetto, tempo di somministrazione, via di somministrazione, tasso di escrezione, e/o eventuali  
25 combinazioni di farmaci.

Quando la somministrazione è a scopo di trattamento, la somministrazione potrà essere a scopo profilattico o a scopo terapeutico. Quando fornita a scopo profilattico, la sostanza viene fornita in anticipo rispetto a qualsiasi sintomo. La somministrazione profilattica della sostanza serve a prevenire o attenuare qualsiasi sintomo successivo. Quando fornita a scopo terapeutico, la sostanza viene somministrata all'esordio (o poco dopo l'esordio) di un sintomo. La somministrazione terapeutica della sostanza serve ad attenuare qualsiasi sintomo esistente.

Il tecnico esperto saprà che certi fattori potranno influenzare il dosaggio richiesto per trattare efficacemente un soggetto tra cui, ma senza limitazioni, la severità della malattia o del disturbo, i trattamenti pregressi, lo stato di salute generale e/o l'età del soggetto, e la presenza di altre malattie. Inoltre, il trattamento di un soggetto con una quantità terapeuticamente efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  può comprendere un trattamento singolo o, preferibilmente, può comprendere una serie di trattamenti. Si apprezzerà inoltre che il dosaggio efficace di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  usata a scopo di trattamento potrà aumentare o diminuire nel corso di un particolare trattamento. Il dosaggio potrà essere passibile di cambiamenti che risulteranno evidenti in base ai risultati di saggi diagnostici come qui descritti.

Le quantità terapeuticamente efficaci di una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  possono essere determinate con studi su animali. Usando i saggi sugli animali, il dosaggio somministrato sarà un dosaggio che fornisce una concentrazione nel tessuto bersaglio che è simile a quella dimostratasi efficace nei saggi sugli animali.

### iii. Composizione farmaceutica

Le varie proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  qui divulgate (anche identificate come "composti attivi") possono essere incorporate in composizioni farmaceutiche adatte per la somministrazione. Tali composizioni comprendono tipicamente la proteina di fusione e un trasportatore farmaceuticamente accettabile. Nel presente contesto, l'espressione "trasportatore farmaceuticamente accettabile" intende comprendere qualsiasi e tutti i solventi, mezzi disperdenti, rivestimenti, agenti antibatterici e antifungini, agenti isotonici, agenti di rallentamento dell'assorbimento e simili che sono compatibili con la somministrazione farmaceutica. L'uso di tali mezzi e agenti per le sostanze farmaceuticamente attive è ben noto nel ramo. L'uso di un qualsiasi terreno o agente convenzionale nelle composizioni è contemplato a

condizione che sia compatibile con il composto attivo. Nelle composizioni è anche possibile incorporare composti attivi supplementari.

5 Una composizione farmaceutica come qui divulgata è formulata per essere compatibile con la sua via di somministrazione prescelta. Esempi di vie di somministrazione comprendono quella parenterale, ad esempio endovenosa, intradermica, sottocutanea, orale (ad esempio inalatoria), transdermica (topica) e transmucosale. In aggiunta, potrà essere desiderabile somministrare una quantità terapeuticamente efficace della composizione farmaceutica localmente, in un'area bisognosa di trattamento. Ciò può essere ottenuto, ad esempio, tramite infusione o perfusione locale o regionale durante un intervento chirurgico, tramite applicazione topica, per iniezione, attraverso un catetere, una supposta o un impianto (ad esempio con impianti formati da materiali porosi, non porosi o gelatinosi, incluse membrane, come membrane o fibre sialastiche), e simili. In un'altra forma esecutiva, la quantità terapeuticamente efficace della composizione farmaceutica viene fornita in una vescicola, come un liposoma (vedere ad esempio Langer, *Science* 249:1527-33, 1990, e Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein e Fidler (redattori), Liss, N.Y., pagg. 35365, 1989).

15 In un'altra forma esecutiva ancora, la quantità terapeuticamente efficace della composizione farmaceutica può essere fornita in un sistema a rilascio controllato. In un esempio, è possibile usare una pompa (vedere ad esempio Langer, *Science* 249:1527-33, 1990; Sefton, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-40, 1987; Buchwald et al., *Surgery* 88:507-16, 1980; Saudek et al., *N. Engi. J. Med.* 321:574-79, 1989). In un altro esempio, è possibile usare materiali polimerici (vedere ad esempio Levy et al., *Science* 228:190-92, 1985; During et al., *Ann. Neurol.* 25:351-56, 1989; Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105-12, 1989). È anche possibile usare altri sistemi a rilascio controllato, come quelli discussi da Langer (*Science* 249:1527-33, 1990).

20 Le soluzioni o sospensioni usate per l'applicazione parenterale, intradermica o sottocutanea possono comprendere i seguenti componenti: un diluente sterile, come acqua per iniezione, soluzione salina, oli fissi, polietilenglicoli, glicerina, propilenglicole, o altri solventi sintetici; agenti antibatterici, come benzil alcool o metil parabeni; antiossidanti, come acido ascorbico o bisolfito di sodio; agenti chelanti, come acido etilendiammintetraacetico; tamponi, come acetati, citrati o fosfati, e agenti di regolazione della tonicità, come cloruro di

sodio o destrosio. Il pH può essere regolato con acidi o basi, come acido cloridrico o idrossido di sodio. Il preparato parenterale può essere racchiuso in ampolle, siringhe monouso o fiale multidose realizzate in vetro o plastica.

5 Le composizioni farmaceutiche adatte per l'uso iniettabile comprendono soluzioni acquose sterili (quando solubili in acqua) o dispersioni sterili, e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni o dispersioni iniettabili sterili. Per la somministrazione endovenosa, i trasportatori adatti comprendono soluzione salina fisiologica, acqua batteriostatica, Cremophor EL™ (BASF; Parsippany, NJ) o soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). In tutti i casi, la composizione deve essere sterile, e dovrà essere abbastanza fluida da poter essere facilmente iniettata attraverso una siringa. Essa deve essere stabile alle condizioni di produzione e conservazione, e deve essere protetta dall'azione contaminante di microrganismi, come batteri e funghi. Il trasportatore può essere un solvente o un mezzo disperdente che, ad esempio, contiene acqua, etanolo, un poliolo (ad esempio glicerolo, propilenglicole, polietilenglicole liquido e simili), e loro miscele adatte. La fluidità corretta può essere ad esempio mantenuta usando un rivestimento, come lecitina, mantenendo la granulometria richiesta nel caso di una dispersione, e adoperando tensioattivi. Per impedire l'azione dei microrganismi, è possibile adoperare vari agenti antibatterici e antimicotici, ad esempio parabeni, clorbutanolo, fenolo, acido ascorbico, timerosal e simili. In molti casi, sarà preferibile che la composizione comprenda agenti isotonici, ad esempio zuccheri, polialcool, come mannitolo, sorbitolo, cloruro di sodio. L'assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili può essere ottenuto includendo nella composizione un agente che ritarda l'assorbimento, ad esempio alluminio monostearato e gelatina.

10

15

20 Le soluzioni iniettabili sterili possono essere preparate incorporando la quantità richiesta del composto attivo in un solvente appropriato, all'occorrenza insieme ad uno o ad una combinazione degli ingredienti elencati sopra, prima di sterilizzare le soluzioni per filtrazione. Le dispersioni vengono generalmente preparate incorporando il composto attivo in un veicolo sterile che contiene un mezzo disperdente basico e gli altri ingredienti richiesti, presi da quelli elencati sopra. Nel caso delle polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi preferiti di preparazione sono l'essiccazione sotto vuoto e l'essiccazione per congelamento, che producono una polvere dell'ingrediente attivo più qualsiasi ingrediente desiderato aggiuntivo da una sua soluzione precedentemente sterilizzata per filtrazione.

Quando somministrati per inalazione, i composti vengono rilasciati in forma di spray per aerosol da un contenitore o erogatore pressurizzato che contiene un propellente adatto, ad esempio un gas, come diossido di carbonio, o da un nebulizzatore.

5 La somministrazione sistemica può essere anche ottenuta con mezzi transmucosali o transdermici. Quando somministrata per via transmucosale o transdermica, la formulazione adopera penetranti adatti per la barriera da permeare. Tali penetranti sono generalmente noti nel ramo e, per la somministrazione transmucosale, comprendono ad esempio detergenti, sali biliari, e derivati dell'acido fusidico. La somministrazione transmucosale può essere ottenuta con l'uso di spray o supposte nasali. Per la somministrazione transdermica, i composti attivi vengono formulati in pomate, balsami, gel o creme come generalmente noto nel ramo. I composti possono anche essere preparati in forma di  
10 supposte (ad esempio con basi per supposte convenzionali, come burro di cacao e altri gliceridi) o clisteri di ritenzione per il rilascio nel retto.

I composti attivi potranno essere preparati con trasportatori che proteggeranno il composto dalla sua rapida eliminazione dal corpo, come una formulazione a rilascio controllato, inclusi impianti e sistemi di rilascio microincapsulati. È possibile usare polimeri biocompatibili e biodegradabili, come etilene-vinil acetato, polianidridi,  
15 acido poliglicolico, collagene, poliortoesteri e acido polilattico. I metodi di preparazione di tali formulazioni risulteranno evidenti agli esperti nel ramo. I materiali possono anche essere ottenuti in commercio da Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Come trasportatori farmaceuticamente accettabili, è anche possibile adoperare sospensioni di liposomi (inclusi liposomi localizzati sulle cellule infettate con anticorpi monoclonali diretti contro antigeni virali). Queste possono essere preparate secondo metodi noti agli esperti nel ramo, ad esempio come descritto nel brevetto US  
20 4.522.811.

È specialmente vantaggioso formulare le composizioni orali o parenterali in una forma di dosaggio unitario che facilita la somministrazione e l'uniformità di dosaggio. Nel presente contesto, una forma di dosaggio unitario identifica unità fisicamente discrete che sono idonee come dosaggi unitari per il soggetto da trattare, ciascuna unità contenendo una quantità predeterminata del composto attivo che è calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in  
25 associazione con il trasportatore farmaceutico richiesto. Le specifiche per le forme di dosaggio unitario dell'invenzione

sono dettate e dipendono direttamente dalle caratteristiche peculiari del composto attivo, dal particolare effetto terapeutico da ottenere, e dai limiti intrinseci nel ramo che sono associati alla compounding di tale composto funzionale per il trattamento di individui.

Le composizioni farmaceutiche possono essere incluse in un contenitore, una confezione o un erogatore  
5 insieme a istruzioni per la somministrazione.

iv. Kit

Nel presente contesto, un "kit" comprende una proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  per l'uso nella modulazione della risposta immunitaria come qui descritto altrove. Nel presente contesto, i termini "kit" e "sistema" intendono  
10 identificare almeno una o più proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  che, in forme esecutive specifiche, sono in combinazione con uno o più altri tipi di elementi o componenti (ad esempio altri tipi di reagenti biochimici, contenitori, confezioni, come confezioni destinate alla vendita commerciale, istruzioni per l'uso, e simili).

V. Identità di sequenza

Come descritto sopra, vengono divulgate varianti e frammenti attivi delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  o dei  
15 polinucleotidi codificanti per le stesse, incluso dei vari componenti della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ . Tali componenti comprendono IL-2, il dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ , le sequenze di raccordo o la sequenza di Kozak. L'attività mantenuta dalla variante o frammento attivo della proteina di fusione, o di un dato componente della proteina di fusione, è qui discussa più nel dettaglio altrove.

Tali varianti possono avere un'identità di sequenza di almeno 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,  
20 98% o 99% con un dato polipeptide o polinucleotide di riferimento. Un frammento può comprendere almeno 10, 20, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 nucleotidi contigui di una data sequenza di nucleotidi di riferimento, o fino all'intera lunghezza di una data sequenza di nucleotidi di riferimento; o un frammento può comprendere almeno 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 amminoacidi contigui di una data sequenza polipeptidica di riferimento, o fino all'intera lunghezza della stessa.

Nel presente contesto, i termini "identità di sequenza" o "identità", nell'ambito di due polinucleotidi o di due  
25 sequenze polipeptidiche, fanno riferimento ai residui nelle due sequenze che, quando le sequenze sono allineate in

modo da ottenere la massima corrispondenza su una finestra di confronto specificata, sono identici. Quando il termine percentuale di identità di sequenza viene usato con riferimento alle proteine, si ravvisa che le posizioni occupate da residui non identici differiscono per sostituzioni di amminoacido conservative dove i residui di amminoacido sono sostituiti da altri residui di amminoacido aventi proprietà chimiche simili (ad esempio carica o idrofobicità), senza  
5 dunque alterare le proprietà funzionali della molecola. Quando le differenze tra le sequenze sono sostituzioni conservative, la percentuale di identità di sequenza potrà essere aggiustata verso l'alto in modo da tenere conto della natura conservativa della sostituzione. Le sequenze che divergono per tali sostituzioni conservative sono dette sequenze che hanno una "somiglianza di sequenza" o una "somiglianza". I mezzi per effettuare tale aggiustamento sono ben noti agli esperti nel ramo. Tipicamente, la procedura prevede di segnare una sostituzione conservativa come un mal  
10 appaiamento parziale, anziché completo, così da incrementare la percentuale di identità di sequenza. Così, ad esempio, dove un amminoacido identico riceve un punteggio di 1 e una sostituzione non conservativa riceve un punteggio di zero, una sostituzione conservativa riceve un punteggio tra zero e 1. Il punteggio per le sostituzioni conservative viene calcolato, ad esempio, come implementato nel programma PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

Nel presente contesto, la "percentuale di identità di sequenza" identifica il valore determinato confrontando due  
15 sequenze allineate su una finestra di confronto in maniera ottimale, in cui la porzione della sequenza polinucleotidica nella finestra di confronto potrà comprendere addizioni o delezioni (ovvero lacune o gap) rispetto alla sequenza di riferimento (che non comprende addizioni o delezioni) per permettere un allineamento ottimale tra le due sequenze. La percentuale viene calcolata determinando il numero di posizioni in cui è presente una base di acido nucleico o un residuo di amminoacido identico in entrambe le sequenze allo scopo di ottenere il numero di posizioni appaiate,  
20 dividendo il numero di posizioni appaiate per il numero totale di posizioni nella finestra di confronto, e moltiplicando il risultato per 100 così da ottenere la percentuale di identità di sequenza.

Se non dichiarato altrimenti, i valori qui forniti di identità/somiglianza di sequenza identificano il valore ottenuto usando GAP, Versione 10, e adoperando i seguenti parametri: % di identità e % di somiglianza per una sequenza di nucleotidi usando un peso di 50 per le lacune, un peso di 3 per la lunghezza e la matrice di punteggio  
25 nwsgapdna.cmp; % di identità e % di somiglianza per una sequenza di amminoacidi usando un peso di 8 per le lacune,

un peso di 2 per la lunghezza e la matrice di punteggio BLOSUM62; o qualsiasi programma equivalente. Con "programma equivalente" si intende qualsiasi programma di confronto di sequenze che, per due date sequenze qualunque, genera un allineamento avente gli stessi appaiamenti tra nucleotidi o residui di amminoacido e la stessa identità di sequenza percentuale del corrispondente allineamento generato con GAP, Versione 10.

5 Qui, a meno che il contesto non indichi chiaramente altrimenti, i termini al singolare "uno", "una" e "il" comprendono i riferimenti al plurale. Analogamente, a meno che il contesto non indichi chiaramente altrimenti, la parola "o" intende comprendere "e". Resterà inoltre inteso che tutte le dimensioni in termini di numero di basi o numero di amminoacidi e tutti i valori di peso molecolare o massa molecolare che vengono dati per gli acidi nucleici o i polipeptidi sono approssimativi e vengono forniti a scopo descrittivo.

10 La materia oggetto della presente divulgazione è ulteriormente illustrata dai seguenti esempi non limitativi.

#### SEZIONE SPERIMENTALE

IL-2 è una sostanza biologica che è stata usata in tentativi di rafforzare le risposte immunitarie nei pazienti con cancro e HIV/AIDS. In tempi più recenti, IL-2 è stata usata a dosi molto più basse per rafforzare selettivamente la tolleranza, allo scopo di sopprimere le risposte immunitarie indesiderate che sono associate agli attacchi di tipo autoimmuni dei tessuti self. È importante notare che queste basse dosi di IL-2 non mostravano segni di potenziamento o riattivazione delle cellule T autoreattive. Tuttavia, IL-2 palesa inconvenienti importanti in quanto sostanza terapeutica, incluse un'emivita molto breve in vivo che ne limita l'efficacia, e una tossicità ad alte dosi. Per queste ragioni, è stato prodotto un nuovo agente biologico a base di IL-2 con gli obiettivi di migliorarne la farmacocinetica e la durata delle risposte, per l'uso 1) in una terapia a base di IL-2 a bassa dose per rafforzare le cellule T regolatorie (Treg) e la tolleranza immunitaria, e 2) in una terapia adiuvante con dosi più alte per rafforzare le risposte immunitarie e la memoria. Per raggiungere questi obiettivi, sono state sviluppate proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$ , con queste fusioni che erano progettate per aumentare la disponibilità di IL-2 incrementando la stimolazione IL-2-mediata persistente dei linfociti portatori di IL-2R in vivo. Queste fusioni sono costituite da proteine ingegnerizzate nel seguente modo (FIG. 1): 1) una sequenza leader di IL-2 che contiene una sequenza di Kozak ottimizzata per una traduzione efficiente; 2) la sequenza a tutta lunghezza di IL-2; 3) una sequenza di raccordo di glicina, o di glicina/serina, di lunghezza variabile; 4)

15  
20  
25

la sequenza codificante del dominio extracellulare espresso di IL-2R $\alpha$ ; 5) un distanziatore di glicina di 2 amminoacidi; 6) una regione di poli-istidina di sei amminoacidi per scopi di purificazione; e 7) due codoni di terminazione. Le sequenze proteiche predette per questi cDNA murini e umani sono mostrate per le proteine di fusione IL-2/(GlySer)/IL-2R $\alpha$  rispettivamente nella FIG. 2A e nella FIG. 2B. Questi cDNA sono stati clonati nel vettore di espressione pCneo, e sono stati usati per esprimere queste proteine di fusione in cellule COS7. Un'analisi dei sovranatanti di coltura ha indicato che ciascuna proteina di fusione murina mostrava bioattività di IL-2 in vitro, con un'attività ottimale associata alla proteina di fusione IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  (FIG. 3A). Di conseguenza, l'inclusione di un anti-IL-2 in questo biosaggio inibiva completamente la proliferazione (FIG. 3B). Esprimendo in cellule CHO e purificando tramite cromatografia di affinità attraverso il legame dell'etichetta 6x-His della proteina di fusione al nichel immobilizzato, sono state preparate quantità maggiori di IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  e IL-2/(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>/IL-2R $\alpha$ . La proteina di fusione IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  murina mostrava una maggiore bioattività di IL-2 rispetto alla IL-2/(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>/IL-2R $\alpha$  (FIG. 4A), benché entrambe le proteine di fusione inibissero in maniera simile il legame di due anticorpi anti-IL-2R $\alpha$  (PC61 e 7D4) (FIG. 4B) a cellule che esprimevano IL-2R $\alpha$ , a conferma del fatto che la prima proteina di fusione è associata ad una maggiore attività di IL-2. L'inibizione del legame di PC61 e 7D4 indica inoltre che la porzione di IL-2R $\alpha$  della proteina di fusione manteneva una struttura terziaria sufficiente per legare questi anticorpi. Tuttavia, queste proteine di fusione non inibivano il legame di un anticorpo monoclonale (3C7), diretto contro il sito legante IL-2 di IL-2R $\alpha$ , alle cellule che esprimevano IL-2R $\alpha$ . Questo risultato implica che la IL-2 all'interno della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  si trova spazialmente in prossimità del sito legante di IL-2R $\alpha$  (FIG. 5). Un'analisi in Western blot di queste proteine di fusione ha mostrato che IL-2/IL-2R $\alpha$  era grande 55-65 kDa con una mobilità un po' più rapida in condizioni non riducenti, e che era approssimativamente 15 kDa più grande della dimensione osservata per l'IL-2R $\alpha$  solubile (FIG. 6A). Analogamente, un'analisi diretta della IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  murina purificata via SDS-PAGE era coerente con una proteina monomerica eterogenea di 55-65 kDa (FIG. 6B), che è la dimensione attesa per una molecola di fusione tra IL-2 (15 kDa) e IL-2R $\alpha$  (40-50 kDa) (FIG. 6), dove IL-2R $\alpha$  mostra un'eterogeneità dimensionale a causa dell'estesa glicosilazione variabile (Malek e Kerty, J. Immunol. 136:4092-4098, 1986). Una conseguenza immediata della trasduzione del segnale dipendente da IL-2 è la fosforilazione della tirosina di STATS (pSTAT5). Il trattamento di topi

con la IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  murina dava luogo ad un'attivazione estesa e selettiva di pSTAT5 nelle Treg a 30 min. post-trattamento (FIG. 7). Studi sulla dose-risposta hanno mostrato che la IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  murina influenzava una serie di attività chiave delle Treg in vivo (FIG. 8). Questi effetti sulle Treg comprendevano: una rappresentanza aumentata (FIG. 8A) e un numero aumentato (non mostrato) di Treg nel compartimento delle cellule T CD4<sup>+</sup>; una sovraregolazione dei CD25 IL-2-dipendenti (FIG. 8B); una proliferazione aumentata, come accertato in base all'espressione del marcatore proliferativo Ki67 (FIG. 8C); e una frazione aumentata del sottoinsieme di Treg Klrp1<sup>+</sup> terminalmente differenziate dipendenti da IL-2 (FIG. 8D). Questi effetti erano particolarmente lampanti per le Treg nella milza e nel pancreas infiammato di topi diabetici non obesi (NOD). 1000 unità dell'attività di IL-2 associata a IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$ , misurata nel biosaggio standard di IL-2 con CTLL, mostravano effetti più bassi ma facilmente misurabili sulle Treg (FIG. 8). Topi C57/BL6 trattati con IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  (2000 unità di attività di IL-2) sono stati confrontati con topi che avevano ricevuto la IL-2 ricombinante (25.000 unità) o complessi agonisti di IL-2/anti-IL-2 (IL2/IC) (10.000 unità di attività di IL-2) (FIG. 9). IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  era molto più efficace della IL-2 ricombinante e leggermente più efficace dei complessi IL2/IC nell'indurre un incremento persistente delle Treg e delle proprietà correlate (FIG. 9). Questi aumenti delle Treg tollerogeniche avvenivano a livelli di attività di IL-2 che erano rispettivamente 5 e 12,5 volte più bassi rispetto a IL2/IC e alla IL-2 ricombinante. In considerazione dell'attivazione IL-2-dipendente di pSTAT5 nelle Treg direttamente ex vivo (FIG. 9), questi dati suggeriscono un'emivita biologica di approssimativamente 72 ore per IL-2/IL-2R $\alpha$ . Topi NOD prediabetici sono stati sottoposti ad un breve ciclo di trattamento con basse quantità di IL-2/IL-2R $\alpha$  (FIG. 10). I topi trattati con 800 U dell'attività di IL-2 associata a IL-2/IL-2R $\alpha$  mostravano un ritardo nell'esordio del diabete. Per quanto riguarda l'immunità, l'applicazione di una singola dose alta di IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  (12.000 U di attività di IL-2) rafforzava sostanzialmente anche le risposte delle cellule T CD8<sup>+</sup>, specie le cellule di memoria a lunga vita (FIG. 11). Subito dopo l'immunizzazione (Giorno 28), le cellule che predominavano nel pool di memoria erano le cellule di memoria effettrici (EM) CD44<sup>alto</sup> CD62L<sup>basso</sup> CD127<sup>alto</sup>; tuttavia, con il trascorrere del tempo, aumentavano le cellule della memoria centrale (CM) CD44<sup>alto</sup> CD62L<sup>alto</sup> CD127<sup>alto</sup> e, a 202 giorni post-immunizzazione, le cellule CM erano le cellule predominanti nel pool di memoria (FIG. 12). Pertanto, IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2R $\alpha$  funziona in maniera analoga alla IL-2 ricombinante per rafforzare

le Treg tollerogeniche e immunosoppressive e l'immunità attraverso un aumento delle risposte delle cellule T effettrici/di memoria, ma mostra una farmacocinetica migliorata perché fornisce tali risposte: 1) a livelli efficaci più bassi di attività di IL-2; 2) con risposte biologiche più persistenti; e 3) preservando la gerarchia, con le cellule Treg che rispondono a dosi più basse rispetto alle cellule T effettrici/di memoria. Questi risultati supportano l'idea che le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  rappresentino una classe nuova e migliorata di farmaci che, quando somministrati alla dose appropriata e secondo il regime appropriato, forniscono un'attività di IL-2 che è in grado di rafforzare selettivamente la tolleranza immunitaria o la memoria immunitaria.

Sono state anche prodotte proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  che comprendono una IL-2 umana e un IL-2R $\alpha$  umano (FIG. 1, FIG. 2B). Questi cDNA sono stati espressi in cellule CHO, e le proteine di fusione secrete sono state purificate tramite cromatografia di affinità al nichel in base all'etichetta 6x-His. Le proteine di fusione avevano raccordi di glicina/serina di lunghezza variabile in analogia a quelli usati per le IL-2/IL-2R $\alpha$  murine. Tutte e 4 le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  umane risultanti mostravano bioattività di IL-2 usando il saggio con CTLL murine (FIG. 13A). Un'analisi in Western blot ha confermato che anche la IL-2/IL-2R $\alpha$  umana mostrava una banda eterogenea tra 55 e 60 kDa (FIG. 13B), coerentemente con le molecole molto glicosilate attese per una IL-2 collegata ad un IL-2R $\alpha$ . Le proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  con i raccordi (G3S) $_3$ , e specialmente con i raccordi (G4S) $_4$ , potrebbero avere un'attività maggiore perché, pur caricando una quantità equivalente di attività di IL-2 in ciascuna corsia, la quantità di proteina di fusione osservata era minore (FIG. 13B). La capacità della proteina di fusione di inibire il legame degli anticorpi monoclonali anti-IL-2R $\alpha$  M-A257 e BC96 a cellule portatrici dell'IL-2R $\alpha$  umano indica che l'IL-2R $\alpha$  nella proteina di fusione manteneva una struttura terziaria sufficiente per legare questi anticorpi (FIG. 14). Tuttavia, queste proteine di fusione inibivano solo parzialmente il legame di un anticorpo monoclonale (BC96) che era diretto contro il sito legante IL-2 di IL-2R $\alpha$ , implicando che la IL-2 all'interno della proteina di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  si trova spazialmente in prossimità del sito legante di IL-2R $\alpha$ . Inoltre, abbiamo stimato che l'attività specifica delle proteine di fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  murine e umane che contenevano (G3S) $_3$  era rispettivamente 80 e 2000 pM per 1 unità/ml di bioattività di IL-2. Questi valori sono molto più alti dell'attività della IL-2 ricombinante, che è 10 pM a 1 unità/ml. Le attività distinte tra le IL-2/IL-2R $\alpha$  umane e quelle murine sono almeno in parte spiegate da una relativa inefficacia delle

5  
10  
proteine di fusione umane nel supportare la proliferazione delle cellule CTLL murine nel biosaggio rispetto alle  
proteine di fusione murine o alle IL-2 ricombinanti murine e umane (non mostrato). Queste attività specifiche  
relativamente basse e i risultati sul blocco degli anticorpi (FIG. 5 e FIG. 12) hanno sollevato la possibilità dell'esistenza,  
nel contesto della proteina di fusione, di un'interazione intramolecolare specifica tra IL-2 e IL-2R $\alpha$  che limita la quantità  
di IL-2 nella proteina di fusione che è disponibile per stimolare le cellule portatrici di IL-2R. Per testare direttamente  
questa idea, due residui di arginina all'interno del sito legante IL-2 dell'IL-2R $\alpha$  umano (vedere Robb et al., Proc. Nat.  
Acad. Sci. USA, 85:5654-5658, 1988) sono stati mutati in treonina e serina. Abbiamo rilevato che la bioattività  
associata a queste proteine di fusione a IL-2R mutanti era molto maggiore (FIG. 15); l'attività specifica delle proteine di  
fusione IL-2/IL-2R $\alpha$  mutate è stata stimata, risultando pari a circa 5 pM per 1 unità/ml di attività di IL-2, un valore  
molto simile a quello della IL-2 ricombinante. Questi dati indicano dunque che la IL-2/IL-2R $\alpha$  umana è biologicamente  
attiva, e che uno specifico meccanismo d'azione che spiega l'attività di IL-2 prolungata in queste proteine di fusione è  
un'interazione competitiva della porzione di IL-2 con la regione legante IL-2 di IL-2R $\alpha$  nella proteina di fusione e con  
le cellule che esprimono IL-2R.

Tabella 1. Riepilogo delle sequenze

SEQ ID NO	AA/NT	Fonte	Descrizione	
1	AA	Umano	IL-2 - non processata	IL-2 con N° acc. GenBank AAB46883  myrmqllscialslavtnsaptssstktqlqehllldlqmilnginn yknpktrmltkfympkkatelkhlqcleelkpleevinlaqsknfhlrprdlisnin vivelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

2	AA	Umano	IL-2 - forma matura	<p>GenBank AAB46883 con i primi 20 aa rimossi</p> <p>aptssstktqlqlehIldIqmilinginnyknpktrmltfkfympkkatelkhlqcle  eelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelgse  tffmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt</p>
---	----	-------	---------------------	---

3	AA	Topo	IL-2 non processata	N° acc. P04351  MYSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSTSSSTAEAQQQQQ QQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLRMLTFKFYL PKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFLEDAENF ISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ
---	----	------	---------------------	--

4	AA	Topo	Forma matura di IL-2	Forma matura del N° acc. P04351  APTSSSTSSSTAEAQQQQQ QQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLTFKFYL PKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENF ISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ
---	----	------	----------------------	--

5	AA	Umano	Forma non processata di IL-2R $\alpha$	<p>N° acc. GenBank NP_000408.1</p> <pre> mdsyllmwglItfImvpgcqaelcdddpeiphatfkamaykegtmlnce ckrgfrriksgslymlctgnsshsswdnqcqctssatnntkqvtpqpee qkerktemqspmqpvdqaslpghcrepppweneateriyhfvvgmqmvy qcvqgyralhrpavesvckmthgktrwtqpqlctgemetsqfpggeekpq aspegrpesetsclvttdfqiqtmaatmetsiftteyqvavagcvflisvllsglt wrrrksrti </pre>
---	----	-------	--	---

6	AA	Umano	Forma matura di IL-2R $\alpha$	<p>Primi aa 1-21 rimossi da NP_000408.1</p> <p>elcdddpeiphatkamaykegtmInceckrgfrrikslyslymctgn  sshsswdnqcqctssatrnrttkqvtpqpeeqrktemqspmqpvdqas  Ipghcrepppweneateriyhfvgqmvyqcvqgyralhrqpaesvckm  thgktrwtqpqlctgemetsqfpggeekpqaspegrpesetsclvttdf  qitemaatmetsiftteyqvavagcvflisvllsgltwqrrqrksrti</p>
---	----	-------	--------------------------------	---

7	AA	Umano	Forma matura del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGN SSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVD QASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPA ESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS CLVTTTDFIQTEMAATMETSIFTTEYQ </pre>
---	----	-------	---	---

8	AA	Topo	Forma non processata di IL-2R $\alpha$	<p>N° acc. NP_032393.3</p> <p>mepriImlgfIsltivpsraelclydppvpnatfkalsyknngtilnce  ckrgfrrlkelvymrclgnswssncqctsnshdksrkqvtalehqkeqq  tttdmqkptqsmhqenItghcrepppwkhedskriyhfvogsvhyecip  gykalqrgpaisickmkcgktgwtqpltcvderehhrflaseesqgsrn  sspesetscpittdfpqptettamtetfvItmeykvavasclflisilIlsqglwqhr  wrksrti</p>
---	----	------	--	---

9	AA	Topo	Forma matura di IL-2R $\alpha$	<p>aa 1-21 rimossi dal N° acc. NP_032393.3</p> <p>elclydpevpnatfkalsyknngtilnceckrgfrrlkeIvymrcIgnswssncqctsn  shdksrkqvtalehqkeqqttdmqkptqsmhqenitghcreppwkhe  dskriyhfvqqsvhyecipgykalqrgpaisickmckgktgwtppqltc  vderehrflaseesqgsrnsspesetscpitttdfpqptettamtetfv  ItmeykvavascIfIIsilIIsIgltwqhrwrksrti</p>
---	----	------	--------------------------------	---

10	AA	Topo	Forma matura del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	elclydpevpnatfkalsykngrilnceckrgfrlkeIvymrclgnswsncqctsn shdksrkqvtaqlehqkeqqttdmqkptqsmhqenitghcrepppwkhe dskriyhfvqgsvhycipgykalqrgpaisickmckgktgwtppqltc vderehrflaseesqgsrnsspesetscpitttdfpqptettamtetfvItmeyk
11	AA		Raccordo (Gly3Ser)4	GGGSGGGSGGGSGGGS
12	AA		Raccordo (Gly3Ser)2	GGGSGGGS
13	AA		Raccordo (Gly3Ser)3	GGGSGGGSGGGS
14	AA		(Gly3Ser)5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
15	AA		Raccordo Gly3	GGG

16	AA	Topo	Forma matura di IL-2-(Gly4Ser)4-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQHQHLEQLLMDLQELLSRMENYRN LKLPRMLTFKPYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAE FISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDDDESATVVDFLRWIAFCQSIISTSPQ GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNC ECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQK EQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSV HYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLASE ESQGSRNSSPESETSCPIITTDFFPQPTETTAMTETFVLTMEYK </pre>
----	----	------	---	---

17	AA	Topo	Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	MDSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKYLKQATELKDLQCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGSGGGSGGGSGGGGSELCLYDP PEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQC TSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTDDMQKPTQSMHQENLTGHCRE PPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVDEREHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPIITTDFFPQPTET TAMTETFVLTMEYK
----	----	------	--	--

18	AA	Topo	Forma matura di IL-2-(Gly4Ser)5-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTSSSTAFAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRN LKLPRMLTFKLYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAE NFI SNI RVTVVKLKGSNTFECQFDESATVVDLRRWI AFCQSI I STSPQ GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKN GTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTA QLEHQKEQQT TTD MQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRI YHF VEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISI CKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREH HRFLASEESQGSRNSSPESETSCPI TTTDFPQPTETTAMTETFLVTMEYK </pre>
----	----	------	--	---

19	AA	Topo	Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)5- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> MDSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKFYLPKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSE LCLYDPPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWS SNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLT GHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKC GKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPIITTTDFPQ PTETTAMTETFVLTMEYK </pre>
----	----	------	--	---

20	AA	Topo	Forma matura di IL-2-(Gly3Ser)4-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRN LKLPRMLTFKFLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAE NFI SNI RVTVVKLKGS DNTFECQFDD ESATVVD FLRRWIAFCQSI I STSPQ GGSGGGGGGGGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRG FRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQT TDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIP GYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSR NSSPESETSCPI TTTDFPQPTETTAMTETFLTMEYK </pre>
----	----	------	---	--

21	AA	Topo	Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> MDSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKYLKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLED AENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGGGGGGGSELCLYDPPEVP NATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNS HDKSRKQVTAQLEHQKEQQT TTD MQKPTQSMHQENLTGHCREPPPW KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQP QLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPI TTTDFPQPTETTAMTE TFVLTMEYK </pre>
----	----	------	--	---

22	AA	Umano	Forma matura di IL-2-(Gly4Ser)4-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNI NVI VLELKGSETTF MCEYADETATI VEFLNRWI TFOQSI I STLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTG NSSHSSWDNQCCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPV DQASLPGHCREPPWENEATERI YHFVVGQMVVYQCVCQGYRALHRGP AESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESET SCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ </pre>
----	----	-------	--	---

23	AA	Umano	Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNI NVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I STL T GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTML NCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVT PQPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFV VGQMYYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEME TSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTEY Q </pre>
----	----	-------	--	---

24	AA	Umano	Forma matura di IL-2-(Gly3Ser)4-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSGGGSELCD DDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHS SWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQAS LPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVC KMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTT TDFQIQTEMAATMETSIFTEYQ </pre>
----	----	-------	--	--

25	AA	Umano	Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	MDRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNI NVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I STL GGGSGGGSGGGSGGGSEL CDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQ MVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQF PGEEKQASPEGRPESETSCLVTTDFQIQTEMAATMETSIFTEYQ
----	----	-------	--	---

26	AA	Umano	Forma matura di IL-2-(Gly3Ser)3-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVI VLELKGSETTF MCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STLTGGGSGGGSGGGSELCDDDPP EIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRI KGSLYMLCTGNSSHSSWD NCCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGH CREPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMT HGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQASPEGRPESETSCLVTTTDF QIQTEMAATMETSIFTTEYQ </pre>
----	----	-------	--	---

27	AA	Umano	Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)3- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNI NVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I STL GGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRR IKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKT TEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQC VQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP QASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
28	NT	Umano	Sequenza di Kozak ottimizzata per il leader di IL-2	gccaccATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTG CACTTGCACAAACAGT

29	NT	Topo	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<pre> ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTCACATTGACACTTGTGCTC CTTGTC AACAGCGCACCCACTTCAAGCTCTACTTCAAGCTCTACAGCG GAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCACCTGG AGCAGCTGTTGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAGCAGGATGGAGAA TTACAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCTCACCTTCAAATTTTACTT GCCAAGCAGGCCACAGAATTGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAGATG AACTTGGACCTCTGCGGCATGTTCTGGATTTGACTCAAAGCAAAGC TTTCAATTGGAAGATGCTGAGAATTTATCAGCAATATCAGAGTAACT GTTGTA AAACTAAAGGGCTCTGACAACACATTTGAGTGCCAATTCGA TGATGAGTCAGCAACTGTGGTGGACTTTCTGAGGAGATGGATAGCCT TCTGTCAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAaggaggatctggagg aggggatcaggaggaggatccggaggaggatctGAACTGTGTCTGTATG ACCCACCCGAGGTCCCCAATGCCACATTCAAAGCCCTCTCCTACAAGA ACGGCACCATCCTAAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGAAGACTA AAGGAATTGGTCTATATGCGTTGCTTAGGAACTCCTGGAGCAGCAA CTGCCAGTGCACCAGCAACTCCCATGACAAATCGAGAAAGCAAGTTA CAGCTCAACTTGAAACCCAGAAAGAGCAACAAACCACAACAGACATG CAGAAGCCAACACAGTCTATGCACCAAGAGAACCTTACAGGTCACTG CAGGGAGCCACCTCCTTGAAACATGAAGATTCCAAGAGAATCTATC ATTTCTGGAAGGACAGAGTGTTCACTACGAGTGTATTCCGGGATAC AAGGCTCTACAGAGAGGTCTGCTATTAGCATCTGCAAGATGAAGTG TGGGAAAACGGGGTGGACTCAGCCCAGCTCACATGTGTAGATGAA AGAGAACCACCGATTTCTGGCTAGTGAGGAATCTCAAGGAAGCA GAAATTTCTCCCGAGAGTGAGACTTCTGCCCATAAACCACACAG ACTTCCCACAACCCACAGAAACAACTGCAATGACGGAGACATTTGTG CTCACAATGGAGTATAAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATA A </pre>
----	----	------	--	---

30	NT	Topo	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<pre> ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTCACATTGACACTTGTGCTC CTTGTCAACAGCGCACCCACTTCAAGCTCTACTTCAAGCTCTACAGCG GAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCACCTGG AGCAGCTGTTGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAGCAGGATGGAGAA TTACAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCTCACCTTCAAATTTTACTT GCCAAGCAGGCCACAGAATTGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAGATG AACTTGGACCTCTGCGGCATGTTCTGGATTTGACTCAAAGCAAAGC TTTCAATTGGAAGATGCTGAGAATTTATCAGCAATATCAGAGTAACT GTTGTA AAACTAAAGGGCTCTGACAACACATTTGAGTGCCAATTCGA TGATGAGTCAGCAACTGTGGTGGACTTTCTGAGGAGATGGATAGCCT TCTGTCAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAaggagggttctggagggt tcagggtggaggttcgggtggaggttctGAACTGTGTCTGTATGACCCACCCGAG GTCCCAATGCCACATTCAAAGCCCTCTCTACAAGAACGGCACCATC CTAAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGAAGACTAAAGGAATTTGGT CTATATGCGTTGCTTAGGAAACTOCTGGAGCAGCAACTGCCAGTGCA CCAGCAACTCCCATGACAAATCGAGAAAAGCAAGTTACAGCTCAACTT GAACACCAGAAAAGAGCAACAAACCACAACAGACATGCAGAAGCCAA CACAGTCTATGCACCAAGAGAACCTTACAGGTCACTGCAGGGAGCCA CCTCCTTGGAAACATGAAGATTC AAGAGAATCTATCATTTCTGTTGAA GGACAGAGTGTTCACTACGAGTGTATTCCGGGATACAAGGCTCTACA GAGAGGTCTGCTATTAGCATCTGCAAGATGAAGTGTGGGAAAACG GGGTGGA CTGAGCCAGCTCACATGTGTAGATGAAAGAGAACACC ACCGATTTCTGGCTAGT GAGGAATCTCAAGGAAGCAGAAATTTCTCT CCCGAGAGTGAGACTTCTGCCCAT AACCCACAGACTTCCACAA CCACAGAAACA ACTGCAATGACGGAGACATTTGTGCTCACAAATGGA GTATAAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA </pre>
----	----	------	--	--



32	NT	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<pre> ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCACTAAGTCTTGCACTT GTCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT ACAACGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAATCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTT TTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGTAAATTTAGCTCAAAGC AAAACTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAATAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggtggaggtggatctggtgga ggtggatcaggtggaggtggatccggtggaggtggatct GAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCCACACGCCACATTCAA AGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCAAG AGAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGCGGGTCACTCTATATGCTCTGTAC AGGAACTCTAGCCACTCGTCTGGGACAACCAATGTCAATGCACAA GCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAACAAGTACACCTCAACCTGAA GAACAGAAAGAAAGGAAACCACAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGC CAGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACCTCCACCA TGGGAAAATGAAGCCACAGAGAGATTTATCATTTCTGTTGGTGGGC AGATGGTTTATTATCAGTGCGTCCAGGGATACAGGGCTCTACACAGA GGTCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGT GGACCCAGCCCCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGGAGACCAAGTCA GTTTCCAGGTGAAGAGAAAGCCTCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGTCT GAGAGTGAAGTCTCTGCCTCGTCACAACAACAGATTTTCAAATACA GACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCCATATTTACAACAGAGT ACCAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA </pre>
----	----	-------	--	--

33	NT	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<pre> ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCACTTGCCTAAGTCTTGCACTT GTCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT ACAACGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAATCCAAAACCTACCAGGATGCTCACATTTAAGTT TTACATGCCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAACCTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACTGACTggtggaggttctggtggaggt tcaggtggaggttcggtggaggttctGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGA GATCCACACGCCACATTCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCA TGTTGAAGTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGCGG GTCACTCTATATGCTCTGTACAGGAACTCTAGCCACTCGTCTGGGA CAACCAATGTCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAAACGAAAC AAGTGACACCTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAAACACAGA AATGCAAAGTCCAATGCAGCCAGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTC ACTGCAGGGAACCTCCACCATGGGAAAATGAAGCCACAGAGAGAAT TTATCATTTCTGTTGGTGGGGCAGATGGTTTATTATCAGTGCCTCCAGG GATACAGGGCTCTACACAGAGGTCCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATG ACCCACGGGAAGACAAGGTGGACCCAGCCCCAGCTCATATGCACAG GTGAAATGGAGACCAGTCAGTTTCCAGGTGAAGAGAAGCCTCAGGC AAGCCCCGAAGGCCGTCTGAGAGTGAAGACTTCTGCCTCGTCAAAA CAACAGATTTTCAAATACAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACG TCCATATTTACAACAGAGTACCAGGGTGGACATCACCATCACCATCAC TAATAA </pre>
----	----	-------	--	---

34	NT	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)3- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<pre> ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCACTAAGTCTTGCACTT GTCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT ACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAATCCCAAACCTACCAGGATGCTCACATTTAAGTT TTACATGCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAATAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggtggaggttctggtggaggt tcaggtggaggttctggtggaggttctggtggaggttctggtggaggt GAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACA CGCCACATTCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACT GTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGCGGGTCACTCTAT ATGCTCTGTACAGGAACTCTAGCCACTCGTCTGGGACAACCAATG TCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAACAAGTGACAC CTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAACACAGAAATGCAAAG TCCAATGCAGCCAGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGG AACCTCCACCATGGGAAAATGAAGCCACAGAGAAATTTATCATTTC GTGGTGGGGCAGATGGTTTATTATCAGTGCGTCCAGGGATACAGGG CTCTACACAGAGTCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGG AAGACAAGGTGGACCCAGCCCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGG AGACCAGTCAGTTTCCAGGTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCCGA AGGCCGTCTGAGAGTGAAGTCTGCTGCTCACAACAACAGATT TTCAAATACAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGAGCTCCATATTT ACAACAGAGTACCAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA </pre>
----	----	-------	--	--

35	NT		Consenso di Kozak	(gcc)gccRccAUGG
36	AA	Topo	Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)3- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<p> MYSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSSTSSSTAEQQQQQQQQQQQH  LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKPYLPKQATELKDLCLEDEL  GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDESA  TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGSELCLYDPPEVPNATFK  ALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSR  KQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDS  KRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISIC27KMKCGKTGWTQPQLTC  VDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPIITTDFFPQPTETTAMTETFVL  TMEYK </p>

37	AA	Topo	Forma matura di IL-2-(Gly3Ser)3-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> MDSMQLASCVTLT LVLLVNSAPTSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFK FYLPKQATELKD LQCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGS DNTFECQFDES A TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGGSELCLYDPPEVPNATFK ALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSN SHDKSR KQVTAQLEHQEQQT TTD MQKPTQSMHQENLTGHCREPP PWKHEDS KRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCV DEREHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPI TTD FPQPTETTAMTET FVLT MEYK </pre>
----	----	------	---	---

38	AA	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)5- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<p>MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGI NN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STL T GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEI PHATFKAMAYK EGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSHSSWDNQCQCTSSATRNT TKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLI C TGEMETSQFPGEEKPOASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETS IFTTEYQ</p>
----	----	-------	--	---

39	AA	Umano	Forma matura della IL-2 umana-(Gly4Ser)5- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNI NVI VLELKGSETTF MCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEL CDDD PPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLY MLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEG RPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ </pre>
40	AA		Sequenza di raccordo (Gly4Ser)4	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
41	AA		Sequenza di raccordo (Gly4Ser)5	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS



43	AA	Umano	Forma matura di IL-2-(Gly3Ser)2-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVI VLELKGSETTF MCEYADETATI VEFNLRWITFCQSI I STLTGGGSGGGSEL CDDDPPEI PHA TFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQC TSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPP WENEATERIYHFVVGQMVYYQCVCQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTR WTQPQLICTGEMETSQFFGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTE MAATMETSIFTTEYQ </pre>
----	----	-------	--	--

44	AA	Umano	Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)2- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNI NVI VLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STL GGGSGGGSEL CDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRI KSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEM QSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGMVYYQCVQG YRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASP EGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
----	----	-------	--	---

45	AA	Umano	Forma matura di IL-2-(Gly3)-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVI VLELKGSETTF MCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLTGGGELCDDDPPEIPHATFKA MAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSA TRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWEN EATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQP QLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAAT METSIFTEYQ </pre>
----	----	-------	--	---

46	AA	Umano	Forma non processata di IL-2-(Gly3)-dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$	MDRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STL GGGELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLC TGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQ PVDQASLPGHCREPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVCVQGYRALHR GPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPES ETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTEYQ
----	----	-------	--	---

47	NT	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)2- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<p>ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTT  GTCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT  ACAACCTGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAAT  TAATAATTACAAGAATCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTT  TTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACATCTTCAGTGTCTAG  AAGAAGAAGTCAAACCTCTGGAGGAAGTGTAAATTTAGCTCAAAGC  AAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA  ATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA  TGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTA  CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggtggaggttctggtggaggt  tcaGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACACGCCACATTC  AAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCA  AGAGAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGCGGGTCACTCTATATGCTCTGT  ACAGGAAACTCTAGCCACTCGTCTGGGACAACCAATGTCAATGCAC  AAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAACAAGTACACCTCAACCTG  AAGAACAGAAAGAAAGGAAAACACAGAAATGCAAAGTCCAATGCA  GCCAGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACCTCCAC  CATGGGAAAATGAAGCCACAGAGAGAAATTTATCATTTCTGTTGGTGGG  GCAGATGGTTTATTATCAGTGCGTCCAGGGATACAGGGCTCTACACA  GAGGTCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAG  GTGGACCCAGCCCCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGGAGACCAGTC  AGTTTCCAGGTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCGAAGGCCGTCC  TGAGAGTGAGACTTCTGCCTCGTCAACAACAGATTTTCAAATACA  GACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCCATATTTACAACAGAGT  ACCAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA</p>
----	----	-------	--	---

48	NT	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly3)-dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<pre> ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCT GTCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT ACAACGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAATCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTT TTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAGAAGTCAAACCTCTGGAGGAAGTGTAAATTTAGCTCAAAGC AAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTTGTAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggtggaggtGAGCTCTGT GACGATGACCCGCCAGAGATCCACACGCCACATTCAAAGCCATGGC CTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCC GCAGAATAAAAAGCGGGTCACTCTATGCTCTGTACAGGAAACTCT AGCCACTCGTCCCTGGGACAACCAATGTCAATGCACAAGCTCTGCCAC TCGGAACACAACGAAACAAGTACACCTCAACCTGAAGAACAGAAA GAAAGGAAAACCCACAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGCCAGTGGACC AAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACCTCCACCATGGGAAAAT GAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTTCGTGGTGGGCAGATGGTTTA TTATCAGTGCGTCCAGGGATACAGGGCTTACACAGAGGTCCTGCTG AGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTGGACCCAGCC CCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGGAGACCAGTCAGTTTCCAGGTG AAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGTCCTGAGAGTGAGAC TTCCTGCCTCGTACAACAACAGATTTTCAAATACAGACAGAAATGGC TGCAACCATGGAGACGTCCATATTTACAACAGGTACCAGGGTGGAC ATCACCATCACCATCACTAATAA </pre>
----	----	-------	---	---

49	NT	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)5- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math></p>	<pre> ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCACTAAGTCTTGCACTT GTCACAAACAGTGCACTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT ACAACGGAGCATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAATCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTT TTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAATAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACTGACTgggtggaggtggatcaggtgga gggtgatctgggtggaggtggatcaggtggaggtggatccggtggaggtggatcGAGCT CTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACACGCCACATTCAAAGCCA TGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCAAGAGAGG TTTCCGCAGAATAAAAAGCGGGTCACTCTATATGCTCTGTACAGGAA ACTCTAGCCACTCGTCTGGGACAACCAATGTCAATGCACAAGCTCTG CCACTCGGAACACAACGAAACAAGTGACACCTCAACCTGAAGAACAG AAAGAAAAGGAAAACACAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGCCAGTGG ACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACCTCCACCATGGGAA AATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTTCGTGGTGGGGCAGATGGT TTATTATCAGTGCGTCCAGGGATACAGGGCTCTACACAGAGGTCCTG CTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTGGACCCA GCCCCAGTCATATGCACAGGTGAAATGGAGACCAAGTCAAGTTCCAG GTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGCTCTGAGAGTGA GACTTCCTGCCTCGTCACAACAACAGATTTTCAAATACAGACAGAAT GGCTGCAACCATGGAGACGTCCATATTTACAACAGAGTACCAGGGTG GACATCACCATCACCATCACTAATAA </pre>
----	----	-------	--	--

50	AA		Raccordo (Gly4Ser)3	GGGGSGGGGS
51	AA		Raccordo (Gly4Ser)2	GGGGS
52	AA		Raccordo (Gly4Ser)1	GGGS
53	NT		Sequenza di Kozak	gccaccATGG

54	AA	Topo	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math> + distanziatore di glicina e regione di poli- istidina</p>	<p>MDSMQLASCVTTLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKYLKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSELCLYDP PEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQC TSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCRE PPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVDEREHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTET TAMTETFVLTMEYKGGHHHHH</p>
----	----	------	---	--

55	AA	Topo	Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)5- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ + distanziatore di glicina e regione di poli- istidina	<pre> MDSMQLASCVTTLVLLVNSAPTSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSE LCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWS SNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTTTDMQKPTQSMHQENLT GHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKC GKTGWTQPQLTCVDEREHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQ PTETTAMTETFVLTMEYKGGHHHHHH </pre>
----	----	------	---	--

56	AA	Topo	Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ + distanziatore di glicina e regione di poli- istidina	<pre> MDSMQLASCVTTLVLLVNSAPTSSSTSSTAEAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKYLKQATELKDLQCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDES TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGSGGGSGGGSELCLYDPPEVP NATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNS HDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPW KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQP QLTCVDEREHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTE TFVLTMEYKGGHHHHHH </pre>
----	----	------	---	--

57	AA	Topo	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)3- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math> + distanziatore di glicina e regione di poli- istidina</p>	<pre> MDSMQLASCVTLLVLLVNSAPTSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGSGGGSELCLYDPPEVPNATFK ALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSR KQVTAQLEHQKEQQT TTD MQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDS KRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCV DEREHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLT MEYKGGHHHHHH </pre>
----	----	------	---	---

58	AA	Umano	Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)2- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ + distanziatore di glicina e regione di poli- istidina	<pre> MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNI NVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I STL T GGGSGGGSEL CDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRI KSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEM QSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCQVG YRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLI CTGEMETSQFPGEEKPQASP EGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTEYQGGHHHHHH </pre>
----	----	-------	---	---

59	AA	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)3- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math> + distanziatore di glicina e regione di poli- istidina</p>	<pre>MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNI NVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I STL GGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRR IKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKT TEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQC VQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP QASPEGRPESETSCLVTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH</pre>
----	----	-------	---	--

60	AA	Umano	Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ + distanziatore di glicina e regione di poli- istidina	<pre> MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI STL GGGSGGGSGGGSGGGSELDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGRFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQ MVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQF PGEEKQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFITTEYQGGH </pre>
----	----	-------	---	--

61	AA	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)4- dominio extracellulare di IL-2R<math>\alpha</math> + distanziatore di glicina e regione di poli- istidina</p>	<pre>MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGLNN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLI SNI NVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFCQSI I STL GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEL CDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTML NCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQQCTSSATRNTTKQVT PQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFV VGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEME TSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTEY QGGHHHHH</pre>
----	----	-------	---	--

62	AA	Umano	Forma matura di IL-2-(Gly3Ser)3-dominio extracellulare di mutIL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNI NVI VLELKGSETTF MCEYADETATI VEFNLRWITFCQSI I STLTGGGSGGGGGSELCDDDPP EIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFTSI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDN QCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHC REPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCQGYRALHRGPAESVCKMTH GKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQI QTEMAATMETSIFTTEYQ </pre>
----	----	-------	--	--

63	NT	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly3Ser)3- dominio extracellulare di mutIL-2R<math>\alpha</math></p>	<p>ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCCTT  GTCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT  ACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAAT  TAATAATTACAAGAATCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTT  TTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACATCTTCAGTGTCTAG  AAGAAGAAGTCAAACCTCTGGAGGAAGTGTAAATTTAGCTCAAAGC  AAAACTTTCCTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA  ATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA  TGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTA  CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACTGACTggagggttctggagggt  tcagggtggaggttcgGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACA  CGCCACATTCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAAGT  GTGAATGCAAGAGAGGTTTACCTCAATAAAAGCGGGTCACTCTAT  ATGCTCTGTACAGGAACTCTAGCCACTCGTCTGGGACAACCAATG  TCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAACAAGTGCAC  CTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAACACAGAAATGCAAAG  TCCAATGCAGCCAGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGG</p> <p>AACTCCACCATGGGAAATGAAGCCACAGAGAAATTTATCATTTC  GTGGTGGGGCAGATGGTTTATTATCAGTGCCTCCAGGGATACAGGG  CTCTACACAGAGTCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGG  AAGACAAGGTGGACCCAGCCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGG  AGACCAAGTCAAGTTCAGGTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCGA  AGGCCGTCTGAGAGTGAAGTTCCTGCCTCGTCAACAACAGATT  TTCAAATACAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCCATATTT  ACAACAGAGTACCAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA</p>
----	----	-------	---	--

64	AA	Umano	Forma matura di IL-2-(Gly4Ser)4-dominio extracellulare di mutIL-2R $\alpha$	<pre> APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATI VEFNRWITFCQSI I STLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFTSI KSGSLYMLCTG NSSHSSWDNQCCCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPV DQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVCQGYRALHRGP AESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKQASPEGRPESET SCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTEYQ </pre>
----	----	-------	--	--

65	NT	Umano	<p>Forma non processata di IL-2-(Gly4Ser)4- dominio extracellulare di mutIL-2R<math>\alpha</math></p>	<pre> ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCT GTCACAAACAGTGACACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT ACAACGGAGCATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAATCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTT TTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAGAAGTCAAACCTCTGGAGGAAGTCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAACTTTCACCTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTTGTAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACTGACTggtggaggtggatctggtgga ggtggatcaggtggaggtggatccggtggaggtggatct GAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACACGCCACATTCAA AGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCAAG AGAGGTTTCACCTCAATAAAAAGCGGGTCACTCTATATGCTCTGTACA GGAACTCTAGCCACTCGTCTGGGACAACCAATGTCAATGCACAAG CTCTGCCACTCGGAACACAACGAAACAAGTACACCTCAACCTGAAG AACAGAAAGAAAGGAAAACCAAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGCC AGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACCTCCACCAT GGGAAAATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTTCGTGGTGGGGCA GATGGTTTATTATCAGTGCGTCCAGGGATACAGGGCTCTACACAGAG GTCCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTG GACCCAGCCCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGGAGACCAGTCAGTTCCA GGTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGCTCTGAGAGTGAAGT CCTGCCTCGTACAACAACAGATTTTCAAATACAGAC AGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCCATATTTACAACAGAGTACC AGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA </pre>
----	----	-------	---	--

Benché l'invenzione di sopra sia stata descritta con un certo dettaglio a titolo illustrativo ed esemplificativo per chiarezza di comprensione, risulterà ovvia la possibilità di apportare certi cambiamenti e modifiche all'interno dell'ambito della presente invenzione, la quale è definita nelle rivendicazioni allegate.

## Rivendicazioni

### 1. Proteina di fusione comprendente:

(a) un primo polipeptide comprendente un'interleuchina-2 (IL-2); in cui il primo polipeptide ha un'identità di sequenza di almeno 70% con SEQ ID NO:2; e

5 (b) un secondo polipeptide, fuso in cornice al primo polipeptide per mezzo di un raccordo, in cui il raccordo è la sequenza riportata in SEQ ID NO:13, e in cui il secondo polipeptide comprende un dominio extracellulare di un recettore per l'interleuchina-2 alfa (IL-2R $\alpha$ ), in cui il secondo polipeptide ha un'identità di sequenza di almeno 70% con SEQ ID NO:7; che ha un'attività biologica del dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$ ;

10 in cui la proteina di fusione ha un'attività di IL-2 aumentata rispetto alla IL-2 nativa; o in cui la proteina di fusione ha una stimolazione IL-2-mediata persistente aumentata dei linfociti portatori di IL-2R in vivo rispetto alla IL-2 nativa.

2. Proteina di fusione della rivendicazione 1, in cui il primo polipeptide comprendente IL-2 ha un'identità di sequenza di almeno 75%, almeno 85%, almeno 90%, almeno 95%, almeno 99% o 100% con SEQ ID NO:2.

15 3. Proteina di fusione della rivendicazione 1 o della rivendicazione 2, in cui il secondo polipeptide comprendente il dominio extracellulare di IL-2R $\alpha$  ha un'identità di sequenza di almeno 75%, almeno 85%, almeno 90%, almeno 95%, almeno 99% o 100% con SEQ ID NO:7.

4. Proteina di fusione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, comprendente

(a) la sequenza di amminoacidi di una qualsiasi di SEQ ID NO:26, 27, 36, 37, 57 o 59; o

20 (b) una sequenza avente un'identità di sequenza di almeno 80%, 85%, 90% o 95% con una qualsiasi di SEQ ID NO:26, 27, 36, 57 o 59.

5. Proteina di fusione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui la proteina di fusione comprende:

(a) la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:62; o

(b) una sequenza avente un'identità di sequenza di almeno 80%, 85%, 90% o 95% con SEQ ID NO:62.

25 6. Polinucleotide comprendente una sequenza di nucleotidi codificante per la proteina di fusione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5.

7. Cellula ospite comprendente il polinucleotide della rivendicazione 6, in cui la cellula ospite è opzionalmente una cellula CHO o una cellula COS.
8. Metodo di produzione della proteina di fusione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, il metodo prevedendo di esprimere il polinucleotide codificante per la proteina di fusione nella cellula ospite della rivendicazione 7, e recuperare la proteina di fusione così prodotta.
9. Proteina di fusione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, per l'uso nel diminuire la risposta immunitaria in un soggetto bisognoso.
10. Proteina di fusione per l'uso secondo la rivendicazione 9, in cui il soggetto ha una malattia autoimmune; opzionalmente in cui la malattia autoimmune è selezionata dal gruppo costituito da diabete di tipo 1, sclerosi multipla, artrite reumatoide, celiachia, lupus eritematoso sistemico, artrite idiopatica giovanile, morbo di Crohn, colite ulcerosa o sclerosi sistemica, malattia dell'innesto contro l'ospite, psoriasi, alopecia areata, e vasculite indotta da HCV.
11. Proteina di fusione per l'uso secondo la rivendicazione 9 o la rivendicazione 10, in cui una quantità terapeuticamente efficace della proteina di fusione comprende da  $10^3$  a  $10^6$  IU di attività di IL-2 per adulto o  $10^4 \pm 100$  volte di attività di IL-2 per adulto.
12. Proteina di fusione di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1-5, per l'uso nel potenziare l'immunogenicità di un vaccino in un soggetto bisognoso o nel superare una risposta immunitaria soppressa ad un vaccino in un soggetto bisognoso.
13. Proteina di fusione per l'uso secondo la rivendicazione 12, in cui la proteina di fusione e il vaccino vanno somministrati simultaneamente.
14. Proteina di fusione per l'uso secondo la rivendicazione 12, in cui la proteina di fusione e il vaccino vanno somministrati in sequenza in qualsiasi ordine.
15. Proteina di fusione per l'uso secondo la rivendicazione 13 o la rivendicazione 14, in cui detto vaccino è un vaccino anticancro.

16. Proteina di fusione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-15, in cui una quantità terapeuticamente efficace della proteina di fusione comprende da almeno  $10^4$  a  $10^7$  IU di attività di IL-2 per adulto o almeno  $10^5 \pm 10$  di attività di IL-2 per adulto.

5 17. Proteina di fusione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9-16, in cui il soggetto è un umano.

10

Il sottoscritto dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale.



Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

5

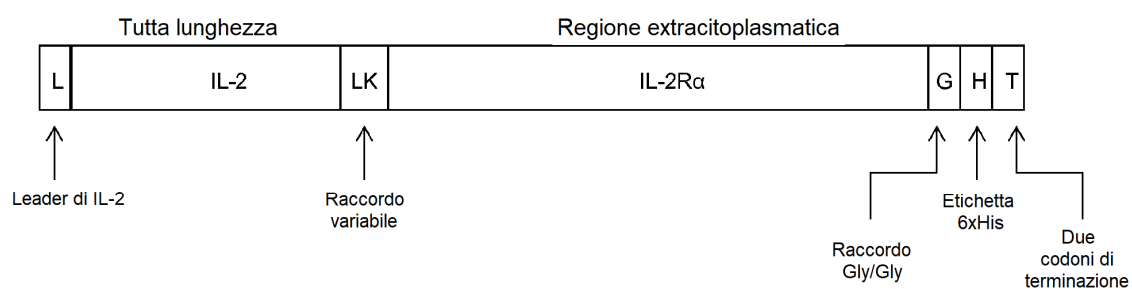


FIG. 1

10

TAVOLA II

Costrutto	Sequenza proteica dedotta
IL-2	MSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSTSSSTAEQAQQQQQQQQLLEQLLMDLQELLS
IL-2-(G45)4-IL-2R $\alpha$	MSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSTSSSTAEQAQQQ-QQQQQQLLEQLLMDLQELLS
IL-2-(G45)5-IL-2R $\alpha$	MSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSTSSSTAEQAQQQ-QQQQQQLLEQLLMDLQELLS
IL-2-(G35)4-IL-2R $\alpha$	MSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSTSSSTAEQAQQQ-QQQQQQLLEQLLMDLQELLS
IL-2-(G35)3-IL-2R $\alpha$	MSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSTSSSTAEQAQQQ-QQQQQQLLEQLLMDLQELLS
IL-2R $\alpha$	-----
IL-2	RMENYRNKLLPRMLTFKTYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENF
IL-2-(G45)4-IL-2R $\alpha$	RMENYRNKLLPRMLTFKTYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENF
IL-2-(G45)5-IL-2R $\alpha$	RMENYRNKLLPRMLTFKTYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENF
IL-2-(G35)4-IL-2R $\alpha$	RMENYRNKLLPRMLTFKTYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENF
IL-2-(G35)3-IL-2R $\alpha$	RMENYRNKLLPRMLTFKTYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENF
IL-2R $\alpha$	-----
IL-2	ISNIRVTVVKLGSDNTEFCQFDDESATVVDFLRWIAFCQSIISTSPQ-----
IL-2-(G45)4-IL-2R $\alpha$	ISNIRVTVVKLGSDNTEFCQFDDESATVVDFLRWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGG9-
IL-2-(G45)5-IL-2R $\alpha$	ISNIRVTVVKLGSDNTEFCQFDDESATVVDFLRWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGGGG
IL-2-(G35)4-IL-2R $\alpha$	ISNIRVTVVKLGSDNTEFCQFDDESATVVDFLRWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGG9--
IL-2-(G35)3-IL-2R $\alpha$	ISNIRVTVVKLGSDNTEFCQFDDESATVVDFLRWIAFCQSIISTSPQGGGGGGG----
IL-2R $\alpha$	-----
IL-2	-----
IL-2-(G45)4-IL-2R $\alpha$	---GGGGGGGGSELCLYDPEVPVNAIFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCL
IL-2-(G45)5-IL-2R $\alpha$	GGGGGGGGGGGGSELCLYDPEVPVNAIFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCL
IL-2-(G35)4-IL-2R $\alpha$	----GGGGGGSELCLYDPEVPVNAIFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCL
IL-2-(G35)3-IL-2R $\alpha$	-----GGGGSELCLYDPEVPVNAIFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCL
IL-2R $\alpha$	-----SELCLYDPEVPVNAIFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCL
IL-2	-----
IL-2-(G45)4-IL-2R $\alpha$	GNWSNSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREEPPPW
IL-2-(G45)5-IL-2R $\alpha$	GNWSNSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREEPPPW
IL-2-(G35)4-IL-2R $\alpha$	GNWSNSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREEPPPW
IL-2-(G35)3-IL-2R $\alpha$	GNWSNSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREEPPPW
IL-2R $\alpha$	GNWSNSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREEPPPW
IL-2	-----
IL-2-(G45)4-IL-2R $\alpha$	KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRPALISICKMKCKGKTGMTQPOLTCVDSREHH
IL-2-(G45)5-IL-2R $\alpha$	KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRPALISICKMKCKGKTGMTQPOLTCVDSREHH
IL-2-(G35)4-IL-2R $\alpha$	KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRPALISICKMKCKGKTGMTQPOLTCVDSREHH
IL-2-(G35)3-IL-2R $\alpha$	KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRPALISICKMKCKGKTGMTQPOLTCVDSREHH
IL-2R $\alpha$	KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRPALISICKMKCKGKTGMTQPOLTCVDSREHH
IL-2	-----
IL-2-(G45)4-IL-2R $\alpha$	RFLASESOGSRNS SPESETSCPITTTDFPQPTETAMTETVLTMEYKGGHHHHHH
IL-2-(G45)5-IL-2R $\alpha$	RFLASESOGSRNS SPESETSCPITTTDFPQPTETAMTETVLTMEYKGGHHHHHH
IL-2-(G35)4-IL-2R $\alpha$	RFLASESOGSRNS SPESETSCPITTTDFPQPTETAMTETVLTMEYKGGHHHHHH
IL-2-(G35)3-IL-2R $\alpha$	RFLASESOGSRNS SPESETSCPITTTDFPQPTETAMTETVLTMEYKGGHHHHHH
IL-2R $\alpha$	RFLASESOGSRNS SPESETSCPITTTDFPQPTETAMTETVLTMEYK-----

FIG. 2A

TAVOLA III

IL-2	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRML
IL-2- (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRML
IL-2- (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRML
IL-2- (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRML
IL-2- (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRML
IL-2R $\alpha$	-----
IL-2	TFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSE
IL-2- (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	TFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSE
IL-2- (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	TFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSE
IL-2- (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	TFKFYMPKAATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSE
IL-2- (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	TFKFYMPKAATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSE
IL-2R $\alpha$	-----
IL-2	TTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STL T-----
IL-2- (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	TTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STL TGGGS-----GGGSELCDDDP
IL-2- (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	TTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STL TGGGS-----GGGSGGSELCDDDP
IL-2- (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	TTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STL TGGGSGGG-----SGGSGGSELCDDDP
IL-2- (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	TTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSI I STL TGGGSGGGSGGSGGSGGSGGSELCDDDP
IL-2R $\alpha$	-----ELCDDDP
IL-2	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR
IL-2- (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR
IL-2- (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR
IL-2- (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR
IL-2- (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR
IL-2R $\alpha$	-----
IL-2	-----
IL-2- (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	NTTKQVTPQPPEEQKERKKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMV
IL-2- (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	NTTKQVTPQPPEEQKERKKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMV
IL-2- (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	NTTKQVTPQPPEEQKERKKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMV
IL-2- (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	NTTKQVTPQPPEEQKERKKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMV
IL-2R $\alpha$	NTTKQVTPQPPEEQKERKKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMV
IL-2	-----
IL-2- (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2- (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2- (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2- (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2R $\alpha$	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2	-----
IL-2- (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
IL-2- (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
IL-2- (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
IL-2- (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
IL-2R $\alpha$	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ-----

FIG. 2B

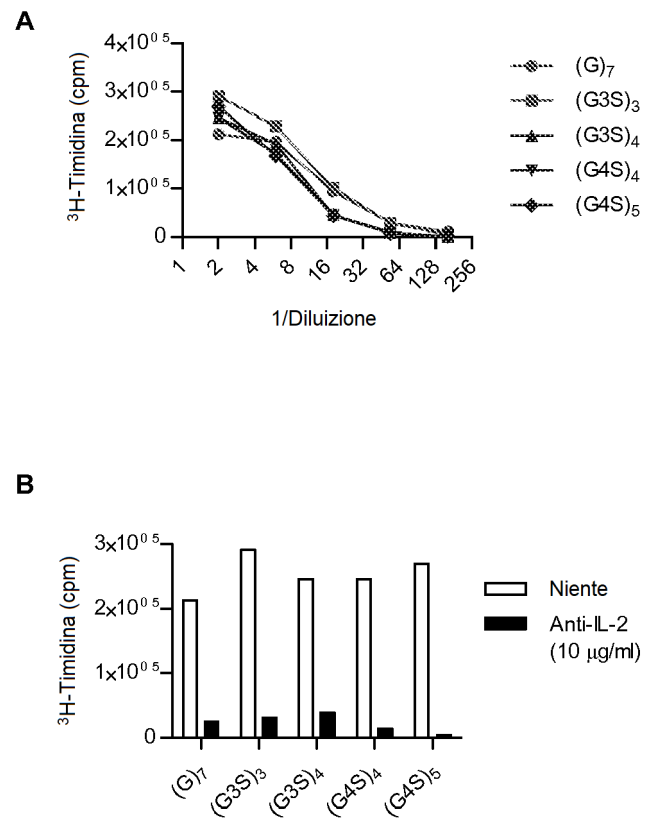
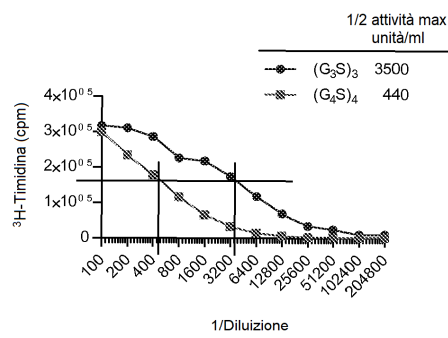


FIG. 3

A



B

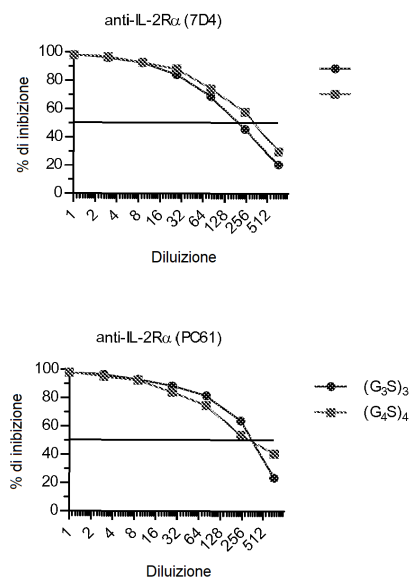


FIG. 4

5

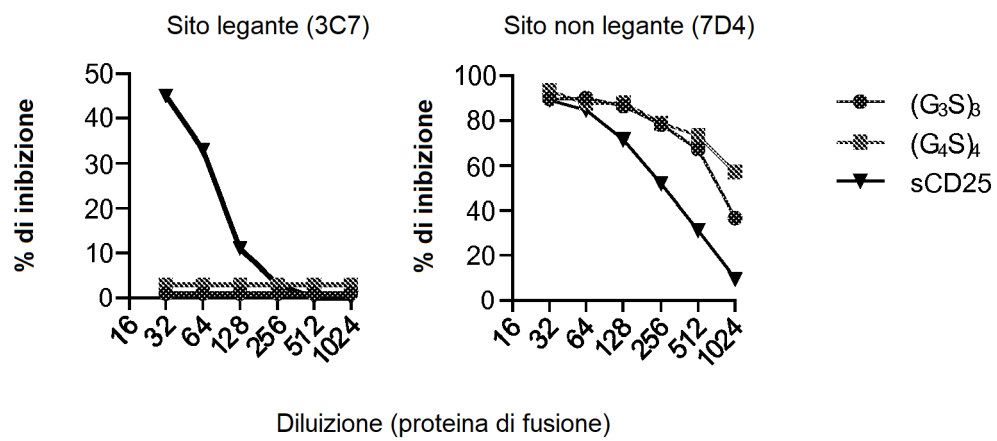


FIG. 5

5

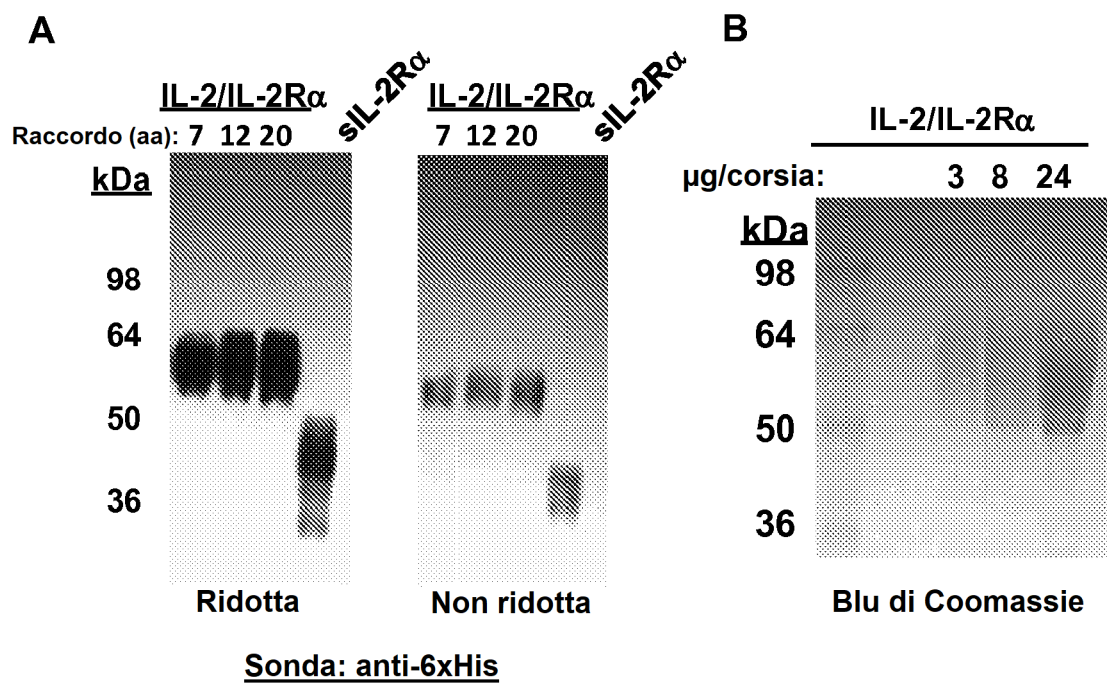


FIG. 6

5

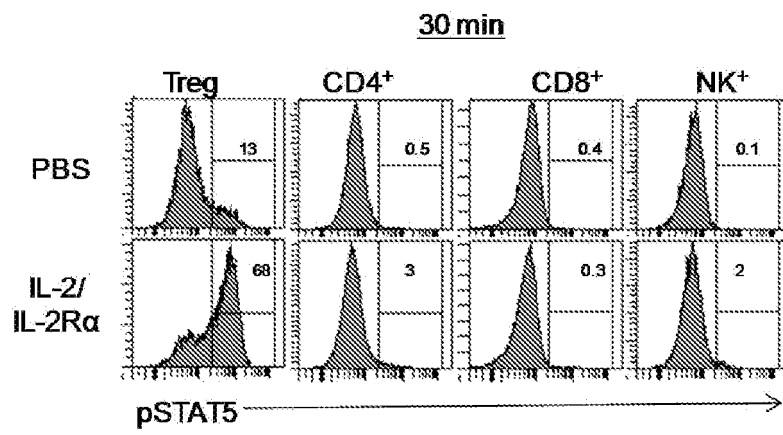


FIG. 7

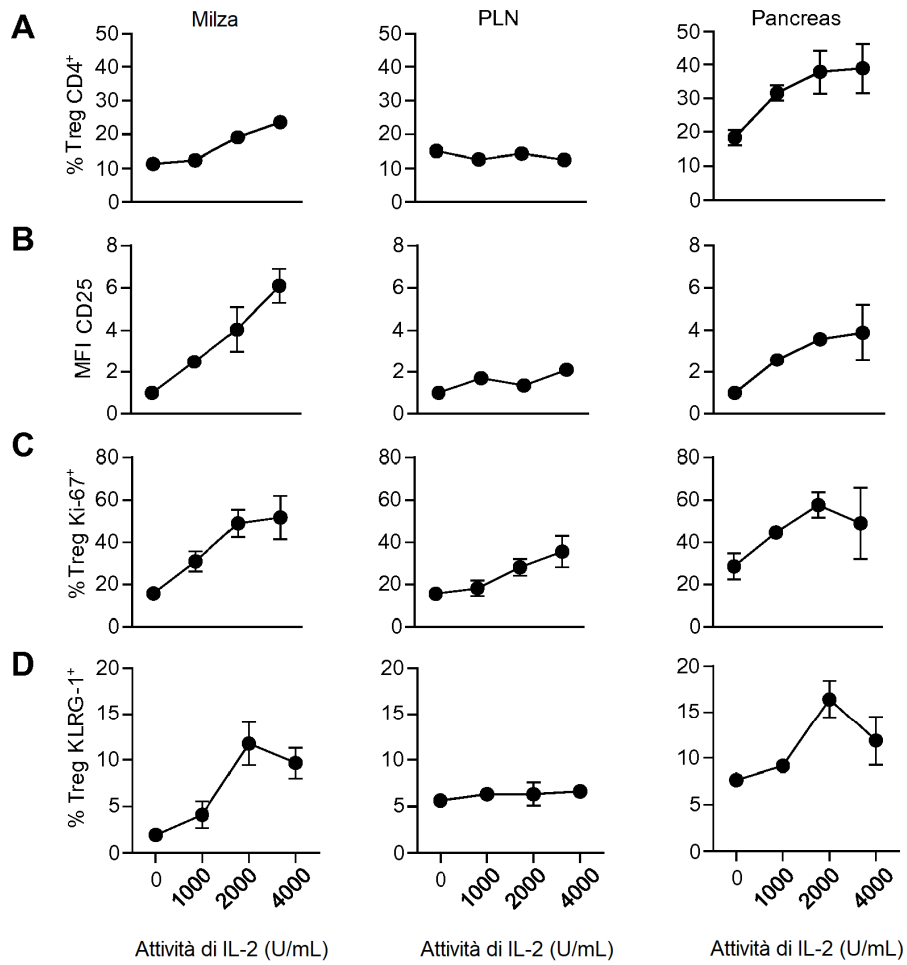


FIG. 8

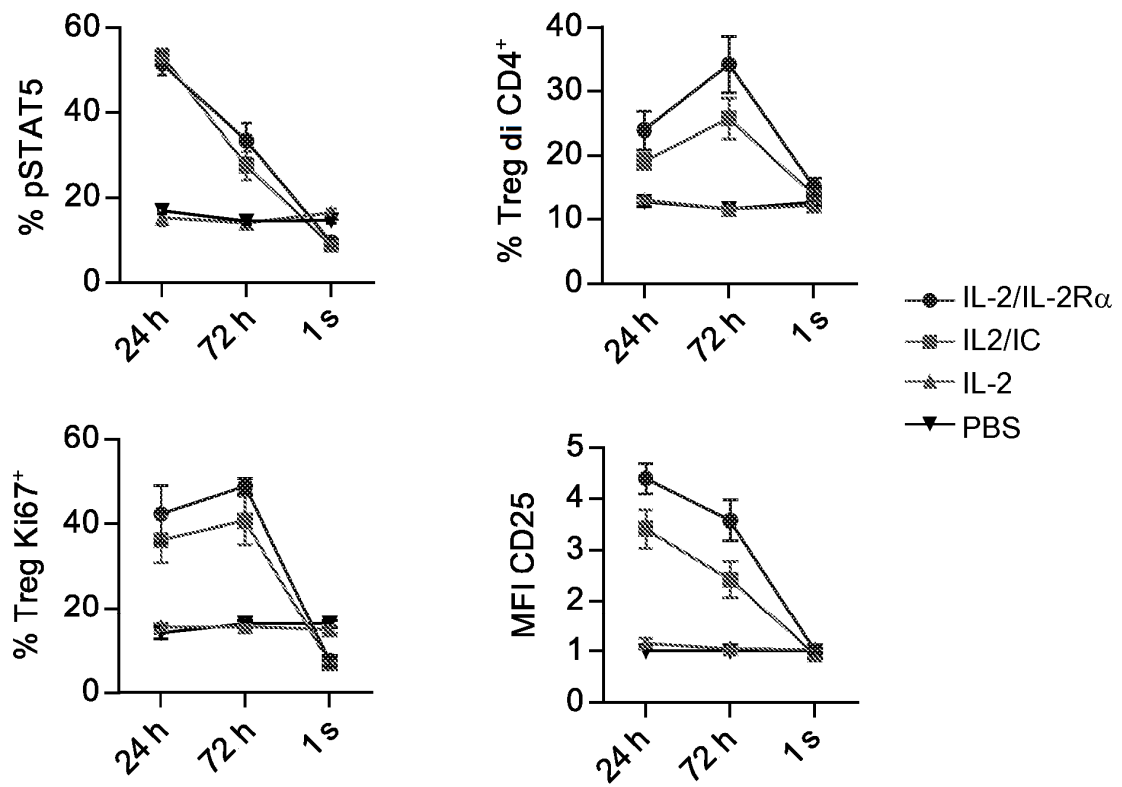


FIG. 9

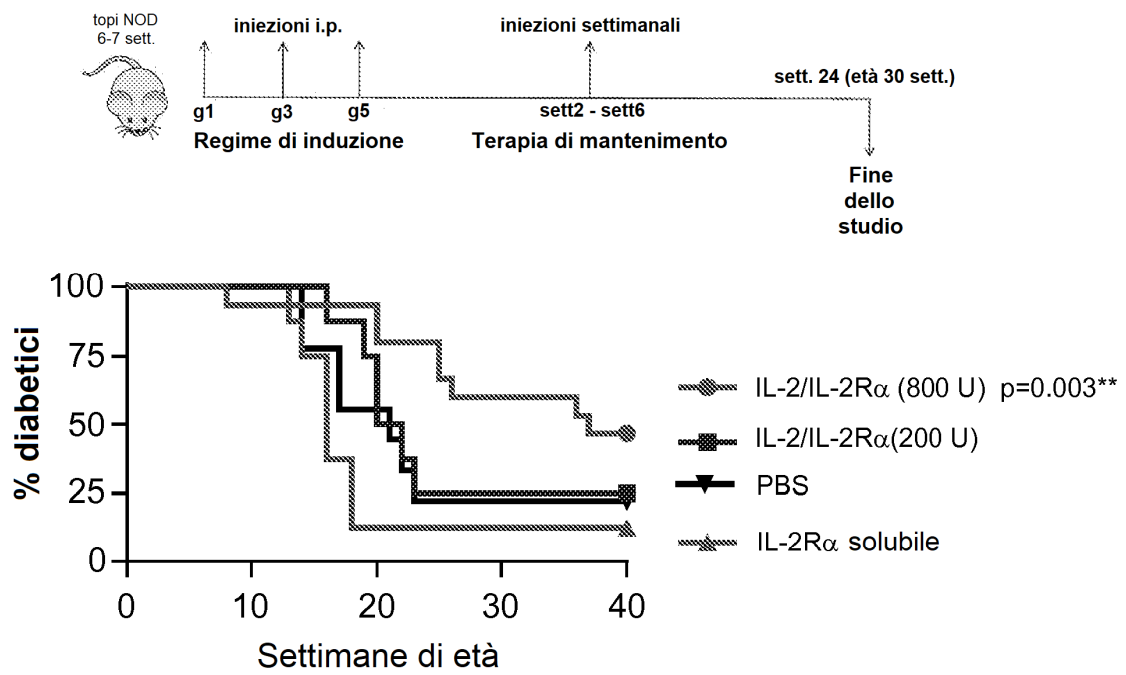


FIG. 10

5

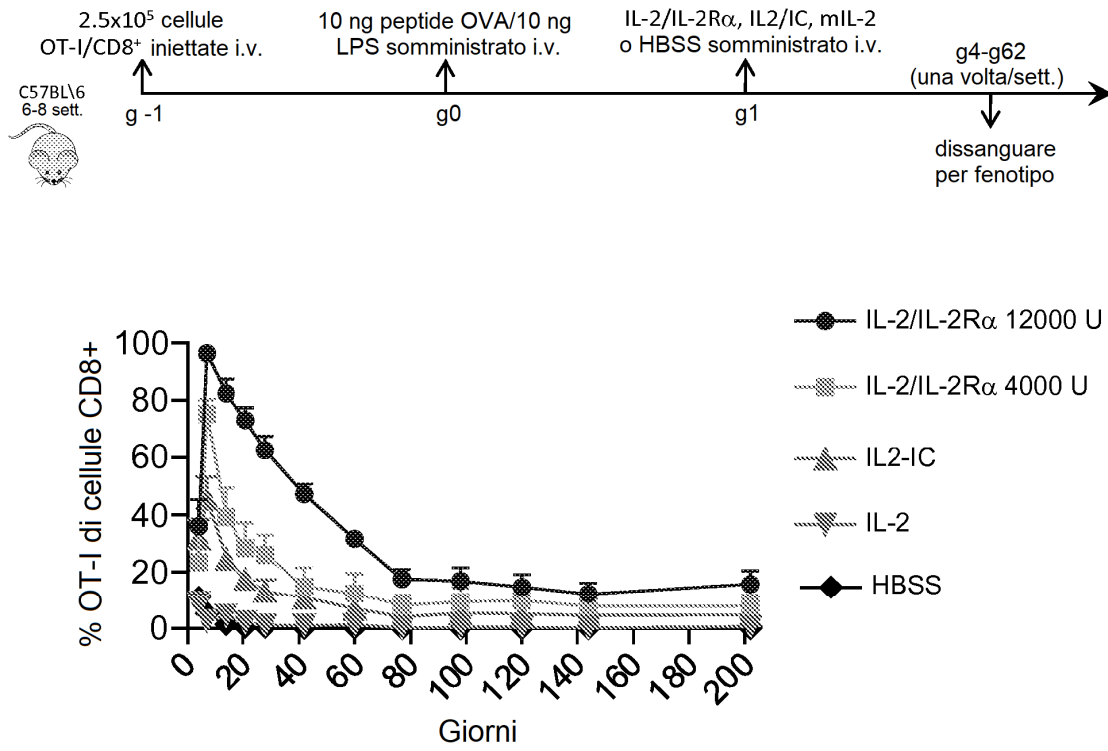


FIG. 11

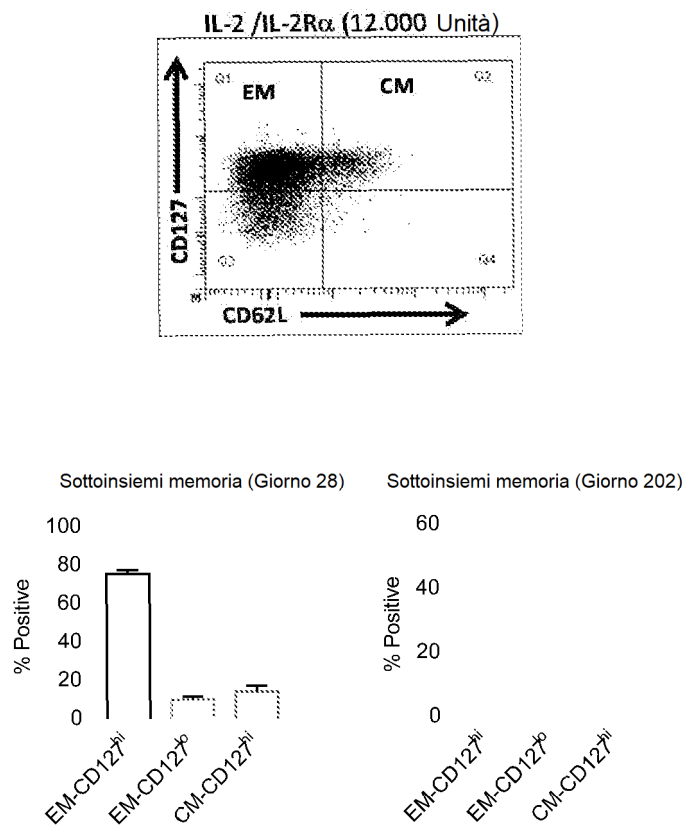


FIG. 12

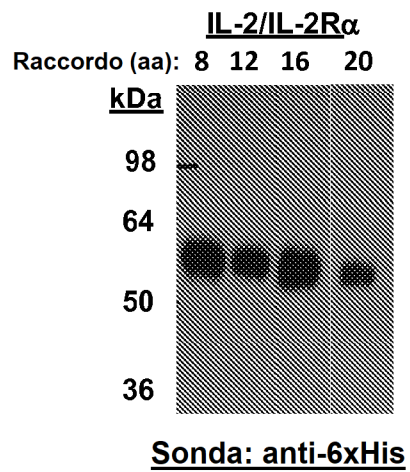
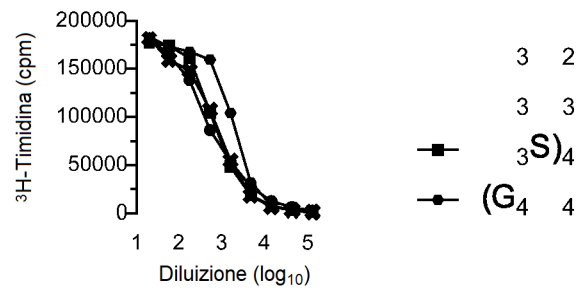


FIG. 13

5

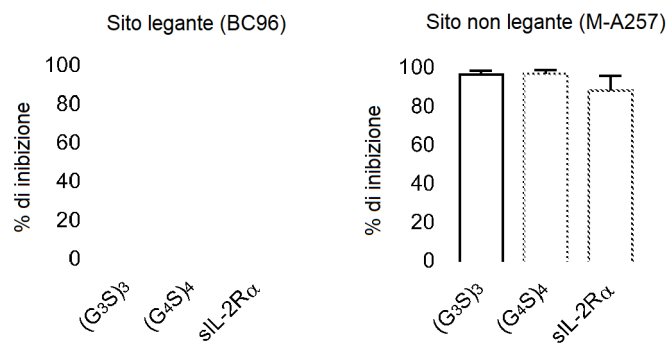


FIG. 14

10

5

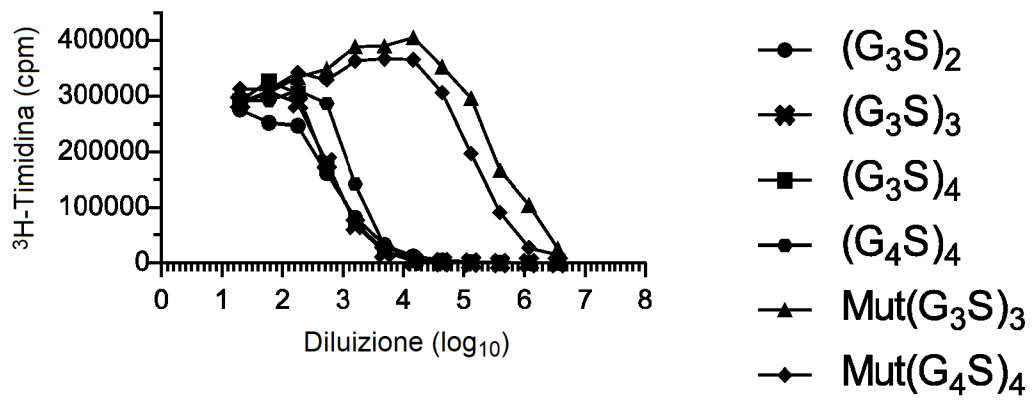


FIG. 15