

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 568**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2013 PCT/US2013/044556**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2013 E 13801437 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2859015**

54 Título: **Ligandos modificados mediante permutación circular como agonistas y antagonistas**

30 Prioridad:

08.06.2012 US 201261657378 P

08.06.2012 US 201261657264 P

08.06.2012 US 201261657285 P

06.11.2012 US 201261723081 P

13.03.2013 US 201361778575 P

13.03.2013 US 201361778812 P

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

11.07.2018

73 Titular/es:

**ALKERMES PHARMA IRELAND LIMITED (100.0%)
Connaught House, 1 Burlington Road
Dublin 4, IE**

72 Inventor/es:

**ALVAREZ, JUAN y
CHAMOUN, JEAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 675 568 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ligandos modificados mediante permutación circular como agonistas y antagonistas

5 Antecedentes de la invención

Las interacciones ligando-receptor son esenciales para una serie de vías de señalización celular. Los factores de crecimiento, las citocinas y otras proteínas reguladoras usan estas interacciones para mediar las respuestas celulares. Las proteínas que inhiben o facilitan estos procesos tienen potencial como agentes terapéuticos.

10 Dados algunos de los inconvenientes de las estrategias de anticuerpos monoclonales para inhibir las funciones ligando-receptor tales como la cara fabricación, el gran tamaño, la limitada penetración en tejidos y los efectos secundarios indeseables, los investigadores se han centrado en el uso de proteínas no de anticuerpos como agentes terapéuticos. Además, Las estrategias de anticuerpos terapéuticos generalmente se limitan a la inhibición o al antagonismo, y no son competentes para estrategias para potenciar o actuar como antagonista de una vía. Por tanto, se están explorando nuevas estrategias de ingeniería de proteínas para desarrollar ligandos y receptores como agonistas y antagonistas de dianas clínicamente importantes como una alternativa a estrategias de anticuerpos.

15 La permutación circular implica la unión de los extremos amino y carboxilo naturales de una proteína, generalmente con un enlazador, y la creación de nuevos extremos amino y carboxilo mediante la escisión en un nuevo sitio en la secuencia de la proteína, generalmente un bucle; de manera tal que la secuencia primaria de la proteína resultante se reorganiza, mientras que la estructura secundaria (y la actividad) se mantiene. Por tanto, la creación de los nuevos extremos puede proporcionar mejores localizaciones para la unión de un miembro de fusión en relación con los extremos naturales.

20 La permutación circular de un ligando de proteína proporciona un medio mediante el cual se puede alterar una proteína para producir nuevos extremos carboxilo y amino sin disminuir la especificidad y la afinidad de unión del ligando de proteína alterado por su diana en relación con su forma natural. Adicionalmente, los nuevos extremos se pueden mover preferentemente a una localización preferencial para incorporar el ligando permutado circularmente en un polipéptido de fusión, y demostrar una mejor actividad en comparación con un polipéptido de fusión que contiene el ligando natural (no permutado circularmente). Los ligandos permutados circularmente se desvelan en el documento WO 95/27732. Las proteínas de fusión que comprenden una interleucina y el dominio de unión de un receptor de interleucina se desvelan en el documento WO 2010/020766. La presente invención proporciona polipéptidos de fusión que comprenden ligandos modificados mediante permutación circular que funcionan como agonistas, superagonistas o antagonistas de una vía de señalización. Tales polipéptidos de fusión son beneficiosos en el tratamiento de muchos trastornos, afecciones y enfermedades que dependen de la interacción ligando-receptor y la transducción de señal. Por ejemplo, tales polipéptidos de fusión que actúan como antagonistas de un receptor diana tienen potencial como agentes terapéuticos para el cáncer y trastornos autoinmunes. Tales polipéptidos de fusión que actúan como agonistas o superagonistas de una vía de señalización tienen el potencial, por ejemplo, en cáncer o en medicina regenerativa.

Sumario de la invención

45 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende los aminoácidos 1 a 303 de la SEQ ID NO: 26, o una secuencia de aminoácidos homóloga a la misma con al menos el 70 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos que comprende una IL-2 permutada circularmente que tiene una selectividad mejorada por IL-2Rβγ sobre IL-2Rαβγ en relación con la IL-2 de tipo silvestre.

50 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de fusión del primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica el polipéptido de fusión del primer aspecto.

55 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un vector recombinante que comprende el ácido nucleico del tercer aspecto.

60 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende el vector del cuarto aspecto.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona el polipéptido de fusión del primer aspecto para su uso en medicina.

65 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona el polipéptido de fusión del primer aspecto para su uso en un método de tratamiento de cáncer o una afección autoinmune.

En el presente documento se desvelan polipéptidos de fusión que comprenden ligandos de polipéptido que se modifican mediante permutación circular y se fusionan con al menos un miembro de fusión de polipéptido en donde tales polipéptidos de fusión tienen funciones o actividades biológicas nuevas, mejoradas o potenciadas en relación con la proteína de fusión análoga con el ligando natural (no permutado circularmente). Tales mejoras incluyen, pero sin limitación, mayor afinidad de unión, mayor actividad, mayor actividad agonista (superagonista), mayor actividad antagonista, mayor accesibilidad, mayor flexibilidad del sitio activo, mayor estabilidad, especificidad de sustrato más amplia y/o cambiada, mayor direccionamiento hacia el tejido, mayor unión de proteínas, mayor direccionamiento de membrana, parámetros farmacocinéticos potenciados, propiedades físicas potenciadas, y combinaciones de las mismas.

Los ligandos permutados circularmente pueden comprender todas o cualquier parte de sus cadenas de polipéptidos naturales, y pueden incluir opcionalmente enlazadores. Los ligandos permutados circularmente se diseñan para estar orientados de forma óptima, de manera que se puedan fusionar con al menos un miembro de fusión de polipéptido deseado sin comprometer la actividad, tal como la afinidad de unión del ligando modificado por su diana. Los ligandos permutados circularmente (modificados) de los polipéptidos de fusión pueden ser al menos tan activos, y preferentemente más activos, que en comparación con sus correspondientes proteínas naturales. En el presente documento se desvelan proteínas de fusión que tienen una mayor afinidad de unión por sus proteínas diana. La afinidad de unión de la proteína de fusión por su proteína diana puede ser al menos 5 veces, preferentemente al menos 10 veces, preferentemente al menos 20 veces, o más, mayor que la afinidad del ligando natural por la diana proteica. El polipéptido de fusión puede tener afinidad de unión por el receptor al menos 10 veces mayor.

Los ligandos se pueden seleccionar del grupo que incluye, pero sin limitación, citocinas, linfocinas, quimiocinas, adipocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas de adhesión celular y neurotransmisores. Los miembros de fusión de polipéptidos pueden ser cualquier polipéptido que proporcione y que mejore la proteína natural. Por ejemplo, los miembros de fusión se pueden seleccionar del grupo que incluye, pero sin limitación, todo o una parte de: glucoproteínas, proteoglicanos, moléculas de señalización celular, proteínas accesorias, receptores solubles, receptores unidos a la membrana, receptores transmembrana, anticuerpos, enzimas, polipéptidos de direccionamiento (por ejemplo, nanocuerpos), mucinas o péptidos de tipo mucina, polipéptidos sintéticos o cualquier combinación de los mismos. Las mejoras incluyen, pero sin limitación, mejoras en la afinidad, agonismo, antagonismo, adición de actividad funcional sinérgica, direccionamiento hacia el tejido, direccionamiento de proteína, direccionamiento de membrana, parámetros farmacocinéticos (por ejemplo, la semivida), o propiedades físicas (por ejemplo, solubilidad).

Tal como se desvela en el presente documento, al menos un miembro de fusión de polipéptidos comprende toda o una parte de una subunidad del receptor diana u otra molécula implicada en su vía de transducción de señal natural. Se entiende que un miembro de fusión de polipéptidos puede comprender un polipéptido que es al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % homólogo a toda o a una parte de una subunidad de un receptor diana u otra molécula implicada en una vía de transducción de señal.

En el presente documento se desvelan polipéptidos de fusión que comprenden un ligando modificado y un miembro de fusión de polipéptidos que están ligados adicionalmente a un segundo miembro de fusión. Los ejemplos de los segundos miembros de fusión incluyen todo o cualquier parte de un anticuerpo (por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo) y cualquiera de los tipos de polipéptidos adecuados como un primer miembro de fusión descritos anteriormente.

En el presente documento se desvelan, los polipéptidos de fusión que funcionan como agonistas nuevos y mejorados (superagonistas) o antagonistas de un receptor tal como un receptor celular que está implicado en la transducción de señal de una vía de señalización celular. Los polipéptidos de fusión se pueden unir a un receptor de diana monomérico, dimérico o multimérico y pueden inhibir o potenciar la dimerización, la trimerización o la multimerización del receptor y/o inhibir o potenciar la transducción de señal y la señalización aguas abajo de una vía celular.

En el presente documento se desvela un polipéptido de fusión que comprende, un primer miembro de fusión de polipéptidos unido a un ligando modificado que se corresponde con un ligando natural específico para un receptor de diana, en donde el ligando modificado se ha permutado circularmente para crear un nuevo extremo N-terminal y un nuevo extremo C-terminal en comparación con el ligando natural, y en donde el nuevo extremo N-terminal o el nuevo extremo C-terminal del ligando modificado está unido a un primer miembro de fusión de polipéptidos para formar un polipéptido de fusión que opcionalmente tiene una mayor afinidad por el receptor de diana en comparación con el ligando natural por el receptor, y en donde tras la asociación del polipéptido de fusión con el receptor de diana, el polipéptido de fusión actúa como superagonista o como antagonista de la actividad del receptor de diana. El nuevo extremo C-terminal y el nuevo extremo N-terminal del ligando modificado puede no alterar cualquier dominio de unión del ligando modificado por el receptor diana.

El receptor diana puede funcionar mediante la formación por etapas de un complejo multimérico de activación para desencadenar una transducción de señal de una vía de señalización celular y en donde tras la unión del polipéptido de fusión al receptor, la transducción de señal tiene efecto superagonista o antagonista.

El polipéptido de fusión se puede unir al receptor y mejorar la formación por etapas del complejo multimérico de activación actuando así como superagonista de la transducción de la señal mediante el receptor diana.

5 El polipéptido de fusión se puede unir al receptor e impedir de forma estérica la formación por etapas del complejo multimérico actuando así como antagonista de la transducción de señal mediante el receptor diana.

10 En el presente documento se desvela un polipéptido de fusión que comprende el ligando modificado y un primer miembro de fusión, en donde el primer miembro de fusión del ligando modificado proviene de toda o una parte de la proteína con la que se habría asociado el ligando natural del receptor diana en la primera etapa de la formación por etapas del complejo multimérico de activación del receptor. El polipéptido de fusión puede comprender la proteína modificada y un miembro de fusión en donde el miembro de fusión de la proteína modificada proviene de toda o una parte de la proteína con la que se habría asociado el receptor diana en etapas aguas abajo de la formación paso a paso del complejo multimérico de activación del receptor.

15 El primer miembro de fusión del heterodímero se puede fusionar al ligando modificado en una posición que está orientada para mejorar la formación paso a paso del complejo multimérico de activación del receptor.

20 El primer miembro de fusión del heterodímero se puede fusionar al ligando modificado en una posición que se orienta para impedir estéricamente la formación del complejo multimérico de activación del receptor.

El polipéptido de fusión puede ser un homodímero que comprende la proteína modificada y un miembro de fusión en donde el miembro de fusión del ligando modificado proviene de todo o una parte del mismo ligando en donde la homodimerización se requiere para la formación del complejo multimérico de activación del receptor.

25 En el presente documento se desvela un método de actuación como superagonista de un receptor diana que comprende la etapa de poner en contacto el receptor con el polipéptido de fusión de la invención.

30 En el presente documento se desvela un método de actuación como antagonista de un receptor diana que comprende la etapa de poner en contacto el receptor con un polipéptido de fusión de la invención.

35 En el presente documento se desvela un método para preparar un polipéptido de fusión que comprende las etapas de: a) seleccionar un ligando natural que se une a un receptor en donde el receptor funciona mediante una formación por etapas de un complejo multimérico de activación para desencadenar una transducción de señal de una vía de señalización celular; b) crear un ligando modificado mediante permutación circular para proporcionar un ligando modificado que tiene un nuevo extremo N-terminal y un nuevo extremo C-terminal en comparación con el ligando natural de la etapa (a); y c) unir un primer miembro de fusión de polipéptido al extremo N-terminal o C-terminal del ligando modificado de la etapa (b) para crear un polipéptido de fusión, en donde los nuevos extremos de N-terminal o C-terminal del ligando modificado se localizan para permitir que el primer miembro de fusión se una al ligando modificado en una posición orientada para actuar como antagonista o superagonista de la función del receptor diana tras la unión del polipéptido de fusión al receptor diana. El método puede comprender adicionalmente fusionar un segundo miembro de fusión al ligando modificado de la etapa (b) en donde el segundo miembro de fusión proporciona una mejora adicional a la proteína, tal como prolongar la semivida del polipéptido de fusión *in vivo*. Otras mejoras que se podrían hacer por ingeniería mediante la etapa (c) incluyen, pero sin limitación, adición de actividad funcional sinérgica, direccionamiento hacia el órgano, direccionamiento hacia el tejido, direccionamiento de proteína, direccionamiento de membrana, direccionamiento de matriz biológica, farmacocinética (por ejemplo, porcentaje de biodisponibilidad) o propiedades físicas (por ejemplo, solubilidad).

Breve descripción de los dibujos

50 FIG. 1. Estructura del complejo hexamérico de señalización IL6 (PDB: 1P9M). Vista lateral (parte superior) y vista superior (parte inferior) del complejo hexamérico que consiste en dos moléculas de IL-6 (gris oscuro), dos moléculas solubles de IL-6R α (D2-D3 de la subunidad α del receptor de IL6, negro) y dos moléculas solubles de gp130 (D1-D2-D3, gris claro).

55 FIG. 2. Ilustración del proceso de permutación circular que utiliza la proteína del conjunto de 4 hélices, IL-6. Representación en cinta de la estructura cristalina de IL-6 (PDB 1P9M, superior izquierda) y de la estructura modelada de una IL-6 permutada circularmente (RDB1503, superior derecha). Los extremos N-terminal y C-terminal se etiquetan como las hélices A, B, C, D según la nomenclatura estándar de IL-6. La proteína permutada circularmente se diseñó uniendo los extremos naturales y creando nuevos extremos entre las hélices C y D de la IL-6 natural. El resultado final de la permutación circular es la reubicación de los términos en la cara opuesta de IL-6. Las secuencias de aminoácidos para IL-6 (restos 47-212 de la SEQ ID NO: 3) y RDB1503 (SEQ ID NO: 1) (medio e inferior, respectivamente) resaltan la secuencia reordenada. El nuevo extremo N-terminal de RDB1503 precede de manera inmediata a la hélice D. El área sombreada en la representación en cintas y la secuencia proteica de RDB1503 resalta el enlazador creado para conectar los extremos N-terminal y C-terminal de la IL-6 natural.

65 FIG. 3. Modelo molecular que ilustra la orientación relativa del D1 (dominio 1 de gp130) cuando se fusiona a IL-6 (FIG. 3A) y RDB1503 (FIG. 3B), dando como resultado las proteínas de fusión RDB1529 y RDB1527,

respectivamente. El dominio D1 está sombreado para resaltarlo. Las partes de gp130 y IL-6R α en el complejo hexamérico activo se incluyen como referencia. El dominio D1 de RDB1529 apunta hacia fuera de la interfaz de unión a gp130 en el complejo activo hexamérico y, por lo tanto, se predice que no puede antagonizar eficazmente la señal (Figura 3A). En contraste, el dominio D1 de RDB1527 participa en la unión a IL-6R α y ocupa el espacio ocupado por la segunda molécula de gp130 en el complejo hexamérico, antagonizando así eficazmente la señal (Figura 3B).

FIG. 4. Curvas de respuesta a la dosis para IL-6 (\blacktriangle) y RDB1503 (\blacklozenge) en el ensayo celular HEK-Blue™. La CE₅₀ se estima a 1 pM y a 0,6 pM, para IL-6 y RDB1503, respectivamente.

FIG. 5. Inhibición de la señalización de IL6 mediante RDB1527 en el ensayo celular HEK-Blue™. Actividad de IL6 ($\text{---}\times\text{---}$) como una función de su concentración en ausencia de inhibición. La inhibición mediante RDB1527 ($\text{---}\blacklozenge\text{---}$), y RDB1529 ($\text{---}\blacklozenge\text{---}$) se midieron en presencia de 12,5 pM de IL6. Todas las mediciones se hicieron por duplicado. El valor estimado de la CI₅₀ para RDB1527 es 0,22 nM. RDB1529 no presentó una fuerte actividad inhibidora.

FIG. 6. Medidas de resonancia de plasmón superficial (SPR) de IL-6R α soluble que se une a IL-6 inmovilizada (FIG. 6A), RDB1529 (FIG. 6B) y RDB1527 (FIG. 6C). Los sensoigramas y las curvas ajustadas están en gris y en negro, respectivamente. Los parámetros cinéticos calculados a partir de los datos están en las tablas insertadas.

FIG. 7. Estructura del complejo de señalización IL-1 β humano (PDB: 4DEP; FIG. 7A) y una representación modelo de la posible formación del complejo mediada por RDB1538 (CP_IL-1 β _IL-1RI (D1-D2); FIG. 7B). IL-1 β (resaltado con una flecha en la estructura) se une a los receptores IL-1RI (negro, que sale del plano) e IL-1RAcP (gris claro, que se aleja del plano). Los extremos naturales N-terminal y C-terminal de IL-1 β no están en estrecha proximidad al extremo C-terminal del dominio D1-D2 de IL1RI. Los extremos de la IL-1 β diseñada y permutada circularmente están ahora próximos al extremo C-terminal del dominio D1-D2 de IL-1RI, facilitando así la generación de la proteína de fusión. El área sombreada resalta el enlazador que conecta la variante IL-1 β permutada circularmente al receptor IL-1RI.

FIG. 8. Estructura del complejo de señalización IL2 humano (PDB: 2ERJ; FIG. 8A) y el complejo de señalización modelado mediado por RDB1405 (CP_IL-2_IL-2R α ; FIG. 8B). IL2 (resaltado con una flecha en la estructura) se une a los receptores IL2R α (gris, parte superior izquierda en el complejo), IL2R β (gris claro, parte inferior izquierda en el complejo) y γ_c (negro, parte inferior derecha en el complejo). IL-2R α estabiliza la conformación de IL-2 para mejorar su afinidad de unión a IL-2R β . Los extremos N-terminal y C-terminal naturales de IL-2 están en la cara distal a la interfaz IL-2/IL-2R α . Los extremos de la IL-2 diseñada y permutada circularmente están ahora próximos a la interfaz IL-2/IL-2R α , facilitando así la generación de la proteína de fusión. El área sombreada resalta el enlazador que conecta la variante de IL-2 permutada circularmente al receptor IL-2R α .

FIG. 9. Es un diagrama que muestra los complejos de señalización representativos para citocinas, y factores de crecimiento que ilustran el ensamblaje multimérico que lleva a la activación.

FIG. 10. Es un diagrama que representa el mecanismo de antagonismo por Picasso3_D1. Los determinantes de unión tanto de IL-6 como de D1 (dominio de gp130) están presentes en la proteína de fusión híbrida dando como resultado una alta afinidad de unión a IL-6R α . Una vez que Picasso3_D1_Fc está unido a IL-6R α , el ensamblaje del complejo de señalización de IL-6 no puede proceder, dando como resultado el antagonismo.

FIGs. 11A y 11B. Respuesta de las células HH (izquierda) y de las células CTLL-2, (derecha) a la IL-2 de tipo silvestre (proleucina) y a variantes diseñadas de IL-2.

FIGs. 12A y 12B. Respuesta de las células HH (izquierda) y de las células CTLL-2, (derecha) a la IL-15 de tipo silvestre y a variantes diseñadas de IL-15.

FIG. 13. Estructura del complejo de señalización IL-15 modelado para las proteínas de fusión CP-IL-15-IL-15R α generado mediante superposición del complejo IL-15/IL-15R α (2Z3Q.pdb en las cadenas de IL-R β e IL-2R γ de la estructura del complejo de señalización ternario IL-2, 2ERJ.pdb). El "enlazador" que une los extremos naturales de IL-15 para crear la variante de IL-15 permutada circularmente y el "espaciador" para crear la fusión CP-IL-15-IL-15R α se resaltan con flechas. Nótese que los extremos naturales de IL-15 (originalmente localizados en el sitio del "enlazador") se orientan muy distalmente de la interfaz de unión de IL-15R α , creando así la necesidad de la permutación circular del ligando.

Descripción detallada de la invención

A continuación, sigue una descripción de las realizaciones preferidas de la invención. En el presente documento se desvelan una proteína de fusión de polipéptidos que presenta un ligando IL-6 permutado circularmente fusionado a una parte de gp130. Se entiende que las funciones, las actividades biológicas y otras características de las realizaciones descritas se aplican generalmente a otros polipéptidos de fusión que comprenden ligandos modificados mediante permutación circular fusionados a miembros de fusión de polipéptidos.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un miembro de fusión de polipéptidos" incluye una pluralidad de miembros de fusión de polipéptidos. En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que se presentan a continuación, se hará referencia a una serie de términos que se definirán con los siguientes significados, a menos que una intención contraria sea evidente.

Definiciones

Las expresiones "permutación circular" y "permutado circularmente" "(PC)" tal como se usan en el presente documento, se refieren al proceso conceptual de tomar una proteína lineal, o su secuencia de ácido nucleico afín y fusionar los extremos naturales N-terminal y C-terminal (directamente o a través de un enlazador, usando proteínas o metodologías del ADN recombinante) para formar una molécula circular, y después cortar (¿abrir?) la molécula circular en una localización diferente para formar una nueva proteína lineal o molécula de ácido nucleico afín, con extremos diferentes a los extremos de la molécula original. La permutación circular, mantiene por lo tanto la secuencia, estructura y función de una proteína (diferente al enlazador opcional), mientras que genera nuevos extremos C-terminal y N-terminal en diferentes localizaciones que, de acuerdo con un aspecto de la invención, da como resultado una orientación mejorada para fusionar un miembro de fusión de polipéptidos deseados en comparación con el ligando original. La permutación circular también incluye cualquier proceso que da como resultado una molécula de cadena lineal permutada circularmente, tal como se define en el presente documento. En general, una molécula permutada circularmente *de novo* se expresa como una molécula lineal y no se somete formalmente a las etapas de circularización y apertura. La permutación circular particular de una molécula, en el presente documento, se designa mediante corchetes que contienen, en el caso de una proteína permutada circularmente, los restos de aminoácidos entre los que se elimina el enlace peptídico. Por ejemplo, la designación IL6(Q182/Q180) designa un factor de crecimiento de IL6 permutado circularmente en el que el sitio de apertura (posición a la cual se elimina el enlace peptídico) tiene lugar entre los restos Q182 y Q180 de la IL-6 natural no permutada o no modificada y, por lo tanto, el extremo N-terminal recién creado es una glutamina que era anteriormente el resto 182 y el extremo C-terminal recién creado es una glutamina que anteriormente era el resto 180.

Un "espaciador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido que une las proteínas que comprenden una proteína de fusión. Generalmente, el espaciador no tiene una actividad biológica específica y su propósito es simplemente unir las proteínas para conservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, los aminoácidos constitutivos de un espaciador se pueden seleccionar basándose en algunas propiedades del enlazador o de la molécula resultante tal como la flexibilidad, la hidrofilia, la carga neta, la susceptibilidad proteolítica o ausencia de la misma, y la ausencia de inmunogenicidad.

Las expresiones ligando, polipéptido, proteína, citocina o factor de crecimiento "no permutado", "natural", de "tipo silvestre" (wt como abreviatura, del inglés *wild type* a lo largo del texto), o "no modificado", se usan en el presente documento para proporcionar un punto de referencia para el ligando, la citocina, el factor de crecimiento o la proteína antes de su reordenamiento en una molécula permutada circularmente, tal como se describe anteriormente. Normalmente, el ligando, el factor de crecimiento o la proteína no modificados tienen los extremos amino y carboxilo y la secuencia de aminoácidos que sustancialmente se corresponden con los extremos amino y carboxilo y la secuencia de aminoácidos del ligando, factor de crecimiento o proteína o un dominio independiente de una proteína, tal como se dan de manera general *in vivo*. El ligando, factor de crecimiento o proteína no modificada puede ser una forma madura completa o un precursor de la forma madura (tal como una proproteína).

El término "ligando" se usa en el presente documento generalmente para denotar cualquier polipéptido (ya sea natural, endógeno o modificado de acuerdo con la invención) que se une a una segunda proteína o receptor y es un componente de una vía bioquímica. Un ligando directa o indirectamente puede afectar (por ejemplo, inducir, inhibir) a la actividad del receptor (por ejemplo, señalización, adhesión).

La expresión "ligando modificado" se usa en el presente documento para indicar un ligando que se ha modificado mediante permutación circular en comparación con el correspondiente ligando natural.

"Actividad" o "actividad biológica" se refiere a una función biológica o a un efecto *in vitro* o *in vivo*, que incluyen, pero sin limitación, la unión al receptor, la actividad antagonista, la actividad agonista, o una respuesta celular o fisiológica.

Un "agonista" es un polipéptido de fusión desvelado en el presente documento que es capaz de unirse a un receptor deseado para dar como resultado un complejo de receptor activado. Un "superagonista" es un polipéptido de fusión de la invención capaz de unirse al receptor diana y que proporciona una activación mejorada del complejo del receptor en comparación con el ligando natural para ese receptor diana. La activación mediante el superagonista de polipéptido de fusión de la invención se puede mejorar al menos dos veces, y preferentemente al menos 5 veces, preferentemente al menos 10 o preferentemente al menos 20 veces o más en comparación con la activación del receptor diana mediante el ligando natural. Un polipéptido de fusión de la invención "que tiene actividad agonista" se refiere al hecho de que los polipéptidos de fusión son capaces de unirse a y de activar o actuar como superagonista de al menos un receptor.

Un "antagonista" es un polipéptido de fusión desvelado en el presente documento que es capaz de unirse a un receptor deseado pero incapaz de mediar cambios conformacionales o ensamblajes moleculares correctos de las moléculas del receptor necesarias para dar como resultado un complejo activado, y mediante lo cual, se inhibe sustancialmente la activación del receptor mediada por ligando natural. La activación del receptor tras la unión de un

ligando adecuado generalmente implica bien un cambio conformacional en el receptor o una diferencia en los estados de asociación del receptor, por ejemplo, oligomerización de las subunidades del receptor o reclutamiento de proteínas o receptores adicionales.

5 El término "receptor" se entiende que indica una proteína presente sobre una superficie celular (o un receptor soluble no presente sobre la superficie celular pero que tiene o se asocia con un receptor de superficie celular equivalente) con el que se une un ligando. Los receptores de superficie celular se componen típicamente de diferentes dominios o subunidades con diferentes funciones, tales como un dominio extracelular (o dominios) que contiene la región con la que interactúa el ligando, un dominio o dominios transmembrana (o en algunos casos, un lípido de anclaje) que
10 ancla el receptor en la membrana celular. En algunos casos, también está presente un dominio efector intracelular que inicia una señal celular en respuesta a la unión del ligando (transducción de señal). Los receptores solubles típicamente se componen de uno o más de los dominios extracelulares que son resultado de la escisión proteolítica de la región de anclaje a la membrana.

15 "Receptores diana" o "ligandos diana" de acuerdo con la invención son las moléculas a las que se diseñan los polipéptidos de fusión de la invención para unirse directamente. En una realización, los "receptores diana" de acuerdo con la invención son capaces de unirse finalmente o de asociarse de otro modo con, moléculas de señalización (por ejemplo, ligandos) en la activación de una transducción de señal en de una vía de señalización celular.

20 Un receptor que se activa mediante "la formación por etapas de un complejo multimérico de activación" es un receptor que además de la unión de uno o más ligandos, requiere la interacción de una o más subunidades proteicas adicionales en un proceso conocido como dimerización, trimerización, multimerización, complejación u oligomerización (también denominado en la materia como "agrupación") para lograr por completo la transducción de
25 señal de una vía de señalización celular. El receptor puede estar ya en la forma de un dímero o multímero antes de la unión del ligando y tras la unión del ligando puede reclutar proteínas solubles o ancladas a la membrana adicionales de manera sucesiva para construir el complejo multimérico de activación de funcionamiento completo.

30 El "radio hidrodinámico" es el radio aparente (R_h en nm) de una molécula en una solución calculada a partir de propiedades de difusión. El "radio hidrodinámico" de una proteína afecta a su tasa de difusión en forma acuosa. El radio hidrodinámico de una proteína está influenciado por su peso molecular así como por su estructura, incluyendo la forma y su compactación y su estado de hidratación. Los métodos para determinar el radio hidrodinámico son bien conocidos en la materia, tales como el uso de DLS y la cromatografía por exclusión de tamaño. La mayoría de las proteínas tiene estructura globular, que es la estructura tridimensional más compacta que puede tener una proteína
35 con el radio hidrodinámico más pequeño. Algunas proteínas adoptan una conformación no estructurada aleatorizada y abierta o 'lineal' y como resultado tienen un radio hidrodinámico mucho mayor en comparación con las proteínas globulares típicas de peso molecular similar.

40 Un "polipéptido de dominio de mucina" se define en el presente documento como cualquier proteína que comprende un "dominio mucina". Un dominio mucina es rico en posibles sitios de glucosilación, y tiene un elevado contenido de serina y/o treonina y prolina, que puede constituir más del 40 % de los aminoácidos. Un dominio mucina está fuertemente glucosilado con glucanos predominantemente enlazados a O.

45 El término "enlazador" o "secuencia de enlazador" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia peptídica que se usa para unir los extremos amino y carboxilo de una proteína (o su correspondiente secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína) a través de enlaces covalentes tanto para el extremo amino como para el extremo carboxilo. En algunas realizaciones, la proteína permutada circularmente se produce mediante la unión de los extremos de la correspondiente secuencia de ADN o de ARN, formando diversos permutantes mediante el corte de la secuencia de ácido nucleico circularizada, y posteriormente la traducción de las secuencias
50 de ácido nucleico para formar la(s) proteína(s) permutadas circularmente.

55 El término "resto" tal y como se usa en el presente documento se refiere a un aminoácido que se incorpora en un péptido. El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural y, salvo que se limite de otro modo, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar que los aminoácidos de origen natural.

60 La expresión "sitio de apertura", tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a la permutación circular, se refiere a la posición en la que un enlace peptídico se eliminaría para formar nuevos extremos amino y carboxilo, bien mediante manipulación de proteínas o de ácido nucleico. El sitio de apertura se designa mediante las posiciones del par de aminoácidos, localizadas entre los extremos amino y carboxilo de la proteína no permutada (natural) que llegan a ser los nuevos extremos amino y carboxilo de la proteína permutada circularmente. Por ejemplo, en IL6(Q182/Q180), el extremo N-terminal recién creado (el nuevo punto de partida de la IL-6 permutada circularmente) es equivalente (estructuralmente) a Q182 de la IL-6 natural y el extremo C-terminal recién creado (el último resto de la IL-6 permutada circularmente) es equivalente (estructuralmente) a Q180 de la IL-6 natural. El resto
65 181 de la IL-6 natural se eliminó en la creación del sitio de apertura.

Los términos "polipéptidos" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento e incluyen proteínas y fragmentos de las mismas. En el presente documento se desvelan polipéptidos como secuencias de restos de aminoácidos. Estas secuencias se escriben de izquierda a derecha en la dirección desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo. De acuerdo con la nomenclatura convencional, las secuencias de restos de aminoácidos se denominan bien mediante un código de tres letras o de una única letra tal como se indica a continuación: Alanina (Ala,A), Arginina (Arg;R), Asparagina (Asn;N), Ácido aspártico (Asp,D), Cisteína (Cys;C), Glutamina (Gln;Q), Ácido glutámico (Glu,E), Glicina (Gly;G), Histidina (his, H), Isoleucina (Ile,I), Leucina (Leu;L), Lisina (Lys;K), Metionina (Met;M), Fenilalanina (Phe;F), Prolina (Pro;P), Serina (Ser;S), Treonina (Thr;T), Triptófano (Trp;W), Tirosina (Tyr.), y Valina (Val,V).

Todas las posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento usan como marco de referencia secuencias para la proteína natural. Por ejemplo, IL-1 β natural (SEQ ID NO:19), IL-6 natural (SEQ ID NO:3), IL-2 natural (SEQ ID NO:20), gp130 natural (SEQ ID NO:21), IL-1RI natural (SEQ ID NO:22), e IL-2R α natural (SEQ ID NO:23) tal como se presentan en el Listado de secuencias. Por ejemplo, una molécula de IL-6 "que comprende los aminoácidos 47 a 212" se referiría a una molécula que tiene aminoácidos que sustancialmente se corresponden con esas posiciones en la SEQ ID NO:3. En el presente documento se usan otras referencias comunes para indicar deleciones o sustituciones para una secuencia usando como referencia secuencias, las respectivas secuencias naturales tal como se citan en el listado de secuencias o cuyo número de registro se proporciona en el presente documento. Las sustituciones de aminoácidos se pueden indicar mediante paréntesis, por ejemplo, "(Ser 287)" se refiere a una molécula que tiene serina en la posición del aminoácido 287. Las moléculas permutadas circularmente se designan mediante la molécula natural seguida entre corchetes que encierran las posiciones de aminoácidos que comprenden el sitio de apertura. Por tanto, por ejemplo, IL6 (182/180) designa una IL6 permutada circularmente en la que el nuevo extremo amino está en el resto de aminoácidos 182, y el nuevo extremo carboxilo está en el resto de aminoácidos 180 de la IL6 natural no permutada. Se reconoce que pueden realizarse algunas sustituciones, adiciones o deleciones a cualquiera de las secuencia descritas en este documento que no alteren la actividad biológica de la región. De hecho, se pueden requerir algunas de tales modificaciones para lograr la expresión de una proteína particular. Por tanto, por ejemplo, se puede añadir una metionina a una secuencia para proporcionar un iniciador.

"Variante" se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido de referencia, pero mantiene sus propiedades esenciales. Una variante típica de un polipéptido difiere de otro polipéptido en su secuencia primaria de aminoácidos. En general, las diferencias son limitadas, de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante sean muy similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia puede diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más modificaciones (por ejemplo, las sustituciones, adiciones y/o deleciones). Un resto de aminoácido sustituido o insertado puede o no estar codificado por el código genético. Una variante de un polipéptido puede ser de origen natural tal como una variante alélica o puede ser una variante que no es conocida por darse en la naturaleza. Además, el término "variante" tal como se usa en el presente documento incluye permutaciones circulares de proteínas y péptidos.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, incluye diversas formas de anticuerpos modificados o alterados, tales como una inmunoglobulina intacta, un fragmento de Fc que comprende la región constante de las cadenas pesadas, un fragmento de Fv que contiene solo las regiones variables de cadena ligera y pesada, un fragmento de Fv enlazado mediante un enlace disulfuro un fragmento Fab o (Fab)₂ que contiene las regiones variables y las partes de las regiones constantes, un anticuerpo de cadena única y similares.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar", o "paliar" o "aliviar" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Estos términos se refieren a una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen pero no se limitan a un beneficio terapéutico y/o a un beneficio profiláctico. Beneficio terapéutico significa la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se está tratando. Además, un beneficio terapéutico se logra con la erradicación o la mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de manera que se observa una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto todavía puede estar afligido con el trastorno subyacente. Para el beneficio profiláctico, las composiciones se pueden administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un sujeto que comunica uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso aunque no se haya hecho un diagnóstico de esta enfermedad.

Un "efecto terapéutico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto fisiológico, incluyendo pero sin limitación, mitigación, mejora o prevención de la enfermedad en seres humanos u otros animales o para mejorar el bienestar físico o mental de seres humanos o animales, causado por una proteína de fusión de la invención que no sea la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por la proteína activa. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "dosis terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refieren a una cantidad de una proteína activa, bien sola o como parte de una composición de proteína de fusión, que es capaz de tener cualquier efecto beneficioso detectable sobre cualquier síntoma,

aspecto, parámetro de medida o características de un estado de enfermedad o afección cuando se administra en una dosis o en dosis repetidas a un sujeto. Dicho efecto no necesita ser absoluto para ser beneficioso.

5 La expresión "régimen de dosis terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una pauta para administrar de manera consecutiva dosis de una proteína activa, bien sola o como parte de una composición de proteína de fusión, en donde las dosis se dan en cantidades terapéuticamente eficaces para dar como resultado un efecto beneficioso sostenido sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o características de un estado de enfermedad o afección.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "dosis" se refiere a la cantidad de polipéptido de fusión de la invención administrado a un sujeto todo de una vez (dosis unitaria) o en dos o más administraciones durante un intervalo de tiempo definido. Por ejemplo, la dosis se puede referir a la cantidad de polipéptido de fusión administrado a un sujeto durante el transcurso de un día (24 horas) (dosis diaria), dos días, una semana, dos semanas, tres semanas o uno o más meses (por ejemplo, mediante una única administración o mediante dos o más administraciones). El intervalo entre dosis puede ser cualquier cantidad deseada de tiempo.

15 La frase, "semivida", se refiere al tiempo que lleva a que la concentración sérica del polipéptido de fusión se reduzca al 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del ligado y/o a la eliminación o el secuestro del ligando doblemente específico mediante mecanismos naturales. La semivida de un polipéptido de fusión aumenta si la presencia en una matriz biológica (sangre, suero, plasma, tejido) persiste, *in vivo*, durante un período más largo en comparación con un control apropiado. La semivida puede aumentar en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más en comparación con un control apropiado.

20 Las secuencias similares u homólogas (por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencia) para las secuencias desveladas en el presente documento también son parte de la invención. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia a nivel de aminoácidos puede ser de aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, el 99 % o más. A nivel de ácido nucleico, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, el 99 % o más. Como alternativa, existe una identidad sustancial cuando los segmentos de ácido nucleico hibriden en condiciones de hibridación selectiva (por ejemplo, condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad) con el complemento de la cadena. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

25 Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" o "similitud" entre dos secuencias (los términos se usan de manera intercambiable en el presente documento) se efectúan del siguiente modo. Las secuencias se alinean para fines comparativos (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o en ambas de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo y pueden descartarse secuencias no homólogas con fines comparativos). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos un 30 %, preferentemente al menos el 40 %, más preferentemente al menos 50 %, incluso más preferentemente al menos el 60 % e incluso más preferentemente al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, "homología" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "identidad" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. En el caso de proteínas relacionadas de manera circular, la secuencia de uno de los miembros necesita ser dividida aproximadamente en dos y alineada en dos secciones para lograr un alineamiento óptimo de los restos funcionalmente equivalentes necesarios para calcular el porcentaje de identidad.

30 Los alineamientos y la homología, similitud o identidad de secuencias de aminoácidos y de nucleótidos, tal como se definen en el presente documento preferentemente se preparan y se determinan usando el algoritmo de secuencias BLAST 2, usando parámetros por defecto (Tatusova, T. A. et al., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999)). Como alternativa, el algoritmo BLAST (versión 2.0) se emplea para el alineamiento de secuencias, con parámetros establecidos a valores por defecto. BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool* o herramienta básica de búsqueda de alineación local) es el algoritmo de búsqueda heurística empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx; estos programas atribuyen importancia a sus hallazgos utilizando los métodos estadísticos de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87(6):2264-8.

35 Salvo que definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por alguien con una habilidad habitual en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, en genética molecular, en química de ácido nucleico, en técnicas de hibridación y en bioquímica). Las técnicas convencionales se usan para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase, de manera general, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc.) y en métodos químicos.

Permutación circular de un ligando de referencia

5 La permutación circular es funcionalmente equivalente a tomar una molécula de cadena lineal, fusionar los extremos para formar una molécula circular, y después cortar la molécula circular en una localización diferente para formar una nueva molécula de cadena lineal con extremos diferentes. La permutación circular, por lo tanto, tiene el efecto de preservar de manera esencial la secuencia y la identidad de los aminoácidos de una proteína mientras se generan nuevos extremos en diferentes localizaciones.

15 Las proteínas de fusión diseñadas apuntan a combinar las propiedades beneficiosas de dos polipéptidos en una única proteína, sin embargo, la construcción de la proteína de fusión viene con diversos retos y riesgos. A menudo, la actividad funcional de la proteína de fusión se compromete en relación con la de la proteína no modificada posiblemente debido a un efecto negativo del miembro de fusión sobre la integridad de la estructura terciaria de la proteína o sobre la capacidad de las proteínas para unirse a miembros afines (por ejemplo, debido al impedimento estérico) para generar su función biológica. Además, la inclusión de espaciadores entre los miembros de fusión puede aumentar el potencial de susceptibilidad a la proteólisis o, en el caso de proteínas terapéuticas, también aumenta el potencial de inmunogenicidad; cuanto más largo es el espaciador, mayor es el riesgo. Por tanto, en la generación de proteínas de fusión, la preservación de la integridad estructural del péptido de fusión, el mantenimiento del acceso sin obstrucciones para la unión a los miembros afines necesarios y la minimización de la longitud de secuencias del espaciador son importantes metas del diseño. Hacia esos objetivos, la utilización de la permutación circular de un ligando tal como se describe en el presente documento proporciona localizaciones preferentes para la fusión a una segunda proteína.

25 Las localizaciones preferentes para los nuevos extremos se favorecen de manera geométrica, estructural y funcional (en relación con los extremos naturales) para la fusión de un miembro de fusión de polipéptidos deseado y reduce la longitud de un espaciador requerido. En una realización, la localización de los nuevos extremos es más próxima a la posición natural de un posible miembro de fusión con el que el ligando se puede asociar normalmente durante la formación por etapas de un complejo de activación de receptor celular. La orientación del ligando modificado y el miembro de fusión en el polipéptido de fusión puede ser óptima para bien potenciar la actividad agonista del ligando para el complejo de activación del receptor, o bien proporcionar impedimento estérico de la formación por etapas del complejo de activación, proporcionando de este modo antagonismo del complejo de activación.

35 El proceso de permutación circular para IL6 se representa de manera esquemática en la FIG 2. Los restos de aminoácidos constituyentes de la proteína IL6 natural se enumeran de manera secuencial del 47 a 212 desde el extremo amino al extremo carboxilo.

40 Para permutar circularmente la IL6, se diseñan construcciones recombinantes de manera que los extremos amino y carboxilo naturales de IL6 se unen mediante una secuencia de enlazador y los nuevos extremos amino y carboxilo se diseñan en los restos de aminoácidos 182 y 180, respectivamente. (FIG. 2). Por tanto, la permutación circular produce una nueva proteína lineal (IL-6 (182/180, también conocida como Picasso3) que, procediendo desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, comprende el segmento de la proteína original que se corresponde con los restos 182 a 212 (ahora 1 a 31) seguido por el enlazador, seguido por un segmento de la proteína original que se corresponde con los restos 49 a 180 (ahora 39 a 107) (FIG. 2).

50 Es importante crear una permutación de un ligando natural que mantendrá la actividad biológica de la forma natural del ligando mientras proporciona unos extremos óptimos para fusionar un miembro de fusión de polipéptido deseado. Si los nuevos extremos interrumpen una región crítica de la proteína natural, se puede perder la actividad. Asimismo, si la unión de los términos originales destruye la actividad, entonces ninguna permutación mantendrá la actividad biológica. Por tanto, hay dos requisitos para la creación de una proteína activa permutada circularmente: 1) Los extremos en la proteína natural deben localizarse favorablemente para que la creación de un ligamiento no destruya la actividad biológica; y 2) Debe existir un "sitio de apertura" donde se puedan formar nuevos extremos sin alterar una región crítica para el plegamiento de la proteína y una actividad biológica deseada.

55 El nuevo extremo N-terminal y el nuevo C-terminal del ligando modificado puede no alterar cualquier dominio de unión del ligando modificado por el receptor diana.

60 Los ligandos modificados pueden ser tan activos como los ligandos originales. En una realización, los ligandos modificados tienen actividad mejorada en comparación con los ligandos originales. La actividad mejorada puede aumentar la afinidad de unión por el receptor diana.

65 Por tanto, en general, son buenos candidatos para la permutación circular las proteínas en las que los extremos de la proteína original están en estrecha proximidad y orientados de manera favorable. Los extremos de la proteína original pueden ser iguales a o menores de 20 Å de diferencia. Cuando los extremos se sitúan de manera natural juntos, se espera que la fusión de los extremos entre sí sea posible y la introducción de un enlazador tenga un efecto

relativamente pequeño. Sin embargo, dado que el enlazador puede ser de cualquier longitud, la estrecha proximidad de los extremos naturales no es un requisito absoluto.

Es deseable usar una secuencia enlazadora en la proteína permutada que preserve el espaciado entre los extremos amino y carboxilo que es comparable con el espaciado entre los extremos amino y carboxilo hallados en la molécula no permutada o natural. La secuencia enlazadora puede ser en sí misma entre al menos aproximadamente un aminoácido a al menos aproximadamente 10 aminoácidos. Se pueden eliminar (por recorte) un pequeño número de aminoácidos de cada extremo para aproximar los extremos. Por ejemplo, en el complejo cristalino de IL-6 con IL-6R y gp130, los extremos de la citocina IL6 tienen 1,6 nm (16 Å) de diferencia (Brevnova et al. (2003) Science 300:2102). La eliminación de los dos primeros restos de N-terminal, que no se requieren estructuralmente o funcionalmente, reduce la distancia entre los extremos a 10,2 Å. Un enlace que preserva esencialmente este espaciado se hace con la secuencia de péptido SGGSGGG (SEQ ID NO: 14). Asimismo, un enlazador preferido para permutar circularmente IL-1 β e IL-2 son GGSGGSG y GG, respectivamente (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente).

La selección de un sitio de apertura se puede determinar mediante una serie de factores. Cuando la conformación tridimensional de la proteína se conoce o se predice, los sitios de apertura preferidos se localizarán en bucles de conexión o en regiones que no presentan una estructura tridimensional altamente regular. Por tanto, se prefiere que los sitios de apertura se seleccionen en regiones de la proteína que no contengan estructuras secundarias definidas tales como alfa hélices, cadenas β y similares. Los métodos de identificación de regiones de estructura secundaria definida basados en la secuencia de aminoácidos están ampliamente disponibles en la red mundial. Además, están disponibles diversos programas para predecir la estructura tridimensional de las proteínas, revisados recientemente en Nayeem et al., Protein Science, 808-24 (2006).

Cuando la retención o la mejora de la bioactividad de la molécula natural se desea en la molécula permutada circularmente, es preferible que el sitio de apertura no esté implicado directa o indirectamente en interacciones con sus miembros de proteína. La elección del nuevo sitio de apertura preferentemente no altera un dominio de unión presente en el ligando natural que está implicado directa o indirectamente en la afinidad de unión del ligando natural por sí receptor diana.

Como alternativa, cuando la sustitución de determinados aminoácidos o la modificación de las cadenas laterales de determinados aminoácidos no cambia la actividad de una proteína, se espera que aquellos aminoácidos no sean críticos para la actividad de la proteína. Por tanto, los aminoácidos que se pueden mutar (*in vivo*) o que ya están modificados *in vivo*, con pequeño impacto sobre la actividad de la proteína, son candidatos potencialmente buenos para sitios de apertura. Los sitios de apertura preferidos en IL-6 están entre los restos 131 y 135 y entre los restos 180 y 182. Un sitio de apertura preferido en IL-1 β está entre los restos 179 y 180 y también entre los restos 223 y 224. Un sitio de apertura preferido en IL-2 está entre los restos 94 y 95.

Cuando la proteína es un miembro de una familia de proteínas relacionadas en una especie, se puede inferir que las secuencias altamente conservadas son críticas para la actividad biológica, mientras que las regiones variables no lo son. Asimismo, se puede inferir que las secuencias altamente conservadas de una proteína que se conservan funcionalmente entre las especies de mamíferos, en particular si hay actividad farmacológica entre especies, son críticas para la actividad biológica. Los sitios de apertura preferidos se seleccionan en regiones de la proteína que no presentan identidad de secuencia altamente conservada entre diversos miembros de la familia de la proteína, bien en la especie o entre especies. Como alternativa, los sitios de apertura preferidos que se identifican en una proteína proporcionan buenas localizaciones candidatas para los sitios de apertura en proteínas homólogas. Los métodos de determinación de identidad de secuencia son bien conocidos para los expertos en la materia y se describen anteriormente.

Un experto en la materia reconocerá que se pueden hacer otras modificaciones. De este modo por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos que aumenten la especificidad o la afinidad de unión del ligando modificado mediante permutación circular. Por lo tanto, cuando hay regiones del ligando que no están implicadas en sí en la actividad del ligando, estas regiones se pueden eliminar o reemplazar con segmentos más cortos que simplemente sirven para mantener las correctas relaciones especiales entre el ligando y las proteínas con las que se pretenden asociar.

Para una serie de ligandos naturales (por ejemplo, factores de crecimiento, citocinas y otras proteínas), los extremos carboxilo y amino se sitúan de manera que cuando los polipéptidos de fusión se forman mediante la unión de un segundo polipéptido o molécula a cualquiera de los extremos del ligando natural, la actividad deseada aguas abajo del segundo polipéptido disminuye de manera significativa o está ausente. El plegamiento anómalo de la proteína o el impedimento estérico se atribuye a menudo para considerar la actividad reducida o ausente del segundo polipéptido. En otros casos, la fusión de un segundo polipéptido a cualquier término de la proteína natural se tolera (es decir, la actividad funcional de la proteína natural no se ve afectada de manera significativa), sin embargo, la orientación del polipéptido de fusión no imparte la actividad deseada a la proteína de fusión, tal como en el caso en el que el polipéptido de fusión pretende inferir (es decir, actuar como antagonista) con la formación de un complejo

de señalización a través de la interferencia estérica cuando la localización del polipéptido de fusión ocupa el espacio que ocuparía una molécula de señalización de aguas abajo en el ensamblaje de un complejo de señalización activo.

5 En contraste, la permutación circular de un ligando tal como se describe en el presente documento proporciona un medio mediante el cual el ligando se puede alterar para producir nuevos extremos carboxilo y amino que permiten la fusión de la segunda molécula o polipéptido sin disminuir la especificidad y la afinidad de unión del ligando alterado en relación con su forma natural, y que también permite que la segunda molécula o polipéptido fusionado imparta, por ejemplo, superagonismo o antagonismo de un complejo de activación de señalización. El polipéptido de fusión puede convertir un ligando natural que es un agonista o un complejo de activación de señalización de diana a un antagonista del complejo de activación de señalización. Esto se ilustra en el contexto de la citocina, IL-6, en las Fig. 1-5.

15 Los polipéptidos de fusión comprendidos por un ligando permutado circularmente fusionado a un miembro de unión, pueden mejorar la afinidad de unión del polipéptido de fusión al receptor natural del ligando natural en relación con la afinidad de unión del ligando natural (no fusionado, no modificado, no permutado) por su receptor natural. Por ejemplo, el Ejemplo 3 compara la afinidad de unión al receptor de IL6 de, 1) un polipéptido de fusión comprendido por IL6 permutado circularmente fusionado al dominio uno de la molécula de señalización transmembrana gp130, con 2) IL-6 natural. Se ha visto que la afinidad de unión del polipéptido de fusión es más de 200 veces mayor que la afinidad de unión de la IL6 natural por el receptor de IL6 (Figs. 6A y 6C).

20 Polipéptidos de fusión

25 En el presente documento se desvelan nuevos polipéptidos de fusión que comprenden ligandos permutados circularmente (modificados) y al menos un miembro de fusión de polipéptido, en donde el polipéptido de fusión opcionalmente posee especificidad y afinidad de unión mayor que la especificidad y afinidad de unión del ligando natural (no permutado) por su receptor diana natural. Adicionalmente, el polipéptido de fusión puede, por ejemplo, diseñarse adicionalmente para generar un antagonista de una vía en donde el ligando funcione como un agonista a través de la unión a un receptor diana tal como se describe en el presente documento.

30 Muchos receptores se unen a ligandos naturales y se agrupan, es decir, forman dímeros, trímeros o multímeros, tras la unión de sus ligandos naturales (receptor dímero o multimérico). Por ejemplo, las citocinas de la familia de IL-1, los factores de crecimiento de fibroblastos, y las citocinas de 4 hélices forman complejos multiméricos de señalización que incorporan diversos números de ligandos y receptores (FIG. 9). La agrupación inducida por ligando (por ejemplo, dimerización, multimerización) a menudo lleva a complejos de mayor afinidad e inicia la transducción de la señal. Por consiguiente, los polipéptidos de fusión pueden, por ejemplo, antagonizar la señalización mediante, por ejemplo, la inhibición de la unión del ligando natural, o la inhibición de la agrupación del receptor (por ejemplo, dimerización, trimerización, multimerización) con o sin la inhibición también de la unión del ligando natural (FIG. 10). Como alternativa, los polipéptidos de fusión pueden mejorar la señalización mediante, por ejemplo, la facilitación de la progresión de la agrupación, a través de la generación de ligandos con mayor afinidad por receptores diana o la preasociación de componentes que llevan a un complejo de señalización. Los polipéptidos de fusión pueden unirse a un ligando o receptor monomérico, o a un complejo dímero o multimérico y pueden inhibir o potenciar una o más etapas en el ensamblaje de complejos de señalización e inhibir o potenciar de este modo la transducción de la señal de una vía celular.

45 Por ejemplo, en la construcción por etapas de complejos de orden superior que llevan a un complejo activo final tal como se establece en el Esquema 1, que es representativo de la vía que lleva a la señalización mediante IL-2 en donde IL-2 es "A", IL-2R α es "B", IL-2R β es "C" y γ c es "D":

50 Esquema 1: $A+B \rightarrow AB$ (etapa 1); $AB + C \rightarrow ABC$ (etapa 2); $ABC + D \rightarrow ABCD$ (etapa 3);

en donde ABCD es el complejo de señalización y la señalización se inicia acercando C y D entre sí. (El complejo de señalización se representa en la FIG. 9 y la estructura de los componentes extracelulares del complejo están en la FIG. 8).

55 Se esperaría que una cadena simple 'AB' preensamblada fuese un superagonista ya que poseería una mayor afinidad para C que cualquiera de A o B y, por lo tanto, facilita el ensamblaje de ABCD a menores concentraciones. En el caso en el que los extremos naturales de "A" no se posicionen para permitir que la proteína de fusión, una proteína de fusión del ligando "A" que se ha modificado mediante permutación circular de acuerdo con la invención, se oriente de manera óptima para fusionarse con "B" permitiendo la generación de la proteína 'AB' de cadena sencilla. La Figura 8 representa esto para el caso de un superagonista de IL-2 diseñado (RDB1405; SEQ ID NO: 12 (proteína) y SEQ ID NO: 13 (ADN)). Sobre los linfocitos T activados, las señales de IL-2 a través del complejo cuaternario de 'alta afinidad' consiste en IL-2, IL-2R α (también denominado CD25), IL-2R β y γ c (FIG. 8A). Aunque IL-2 se puede unir mucho más débilmente a IL-2R β en ausencia de IL-2R α , la unión de IL-2R α a IL-2 estabiliza la conformación de IL-2 para la presentación a IL-2R β con mucha mayor afinidad. γ c se recluta después a la superficie compuesta formada por el complejo IL-2/IL-2R β . La expresión de una proteína de fusión de IL-2 natural con IL-2R α es un reto porque los extremos de IL-2 están en la cara opuesta polar con la que interactúa IL-2R α , requiriendo un

espaciador para abarcar más de 5 nm (50 angstroms) y alterar probablemente la capacidad de unión de la proteína de fusión (FIG. 8A, los extremos de IL-2 están en la parte inferior apuntando hacia fuera de IL-2R α en la parte superior). De hecho, recientemente se ha descrito una proteína de fusión IL-2/IL-2R α con un espaciador largo, y es capaz de promover una señal en ausencia de una escisión del enlazador mediada por proteasa con la posterior liberación de IL-2 (Puskas et al., *Immunology*, 133(2), 206-220 (2011)). Los extremos de IL-2(95/94) permutada circularmente se diseñan para estar en la cara proximal a la interfaz de unión con IL-2R α , reduciendo de manera significativa la longitud del espaciador requerido para generar una proteína de fusión que se pueda ensamblar como un complejo activado y pueda funcionar como un superagonista (FIG. 8B). (La distancia entre el extremo C-terminal de la IL-2 permutada circularmente y el extremo N-terminal de IL-2R α es de aproximadamente 1,1 nm (11 angstroms); el diseño de la construcción de fusión, RDB1405 contiene un espaciador de 6 aminoácidos entre IL-2 y IL-2R α).

Como alternativa, la construcción por etapas de complejos multiméricos de activación para la transducción de la señal ofrece la oportunidad de crear potentes antagonistas. En este caso, se modifica el ligando mediante permutación circular para proporcionar un extremo N-terminal o C-terminal que facilita la unión de un miembro de fusión en una orientación que impide estéricamente la formación por etapas de un complejo multimérico de activación de un receptor diana, y en algunos casos, el miembro de fusión puede aumentar además la afinidad de unión al receptor diana, si, por ejemplo, el miembro de unión es una proteína o dominio que en sí contiene determinantes de unión al receptor diana. Esto último se representa en el contexto de la citocina, IL-6, en las Figs. 1-5 y 10. En este ejemplo, el polipéptido de fusión comprende interleucina 6 (IL-6) permutada circularmente fusionada a un polipéptido que comprende el dominio D1 del receptor transmembrana gp130, que es un componente natural del complejo hexamérico de señalización de IL-6. El ligando permutado circularmente (RDB1503) (FIG. 2), en ausencia de un miembro de fusión, mantiene la misma actividad agonista que la IL-6 de tipo silvestre (FIG. 4) y, por lo tanto, mantiene las interacciones necesarias con IL-6R α y gp130. El complejo hexamérico de señalización de IL-6 se compone de 2 de cada de IL-6, IL-6R α y gp130 (FIG. 1). La señal se inicia a través del dominio citoplasmático de las dos moléculas de gp130 cuando dos heterotrimeros (cada uno con una molécula de cada de IL-6, IL-6R α , y gp130) se unen (FIG. 1). La fuerza conductora para la etapa final en la formación del complejo son las interacciones simétricas entre los dominios D1 de gp130 de un heterotrimerico con IL-6 e IL-6R α del otro heterotrimerico. Una fusión del dominio D1 de gp130 a la IL-6 natural orienta el dominio D1 fuera de la interfaz de gp130 (FIG. 3A) y da como resultado una proteína (RDB1529) que no actúa como antagonista de la señalización mediada por IL-6 (FIG. 5). En contraste, una fusión del dominio D1 a la IL-6 permutada circularmente (RDB1527) orienta el D1 de manera que pueda interactuar con IL-6R α de una manera análoga al complejo hexamérico, y de manera importante, impide estéricamente la unión del dominio D1 de un según heterotrimerico (FIG. 3B) y, por lo tanto, es un potente antagonista de la señalización mediada por IL-6 (FIG. 5). Como la proteína de fusión CP_IL-6_D1 ahora lleva los determinantes de unión de IL-6R α combinados de la IL-6 no modificada y el dominio D1 de gp130 natural en un único polipéptido, la afinidad de unión del polipéptido de fusión se mide para ser 40 pM, más de 200 veces mayor que la afinidad de unión de IL6 natural para la IL-6R α (Figs. 6A y 6C).

En el presente documento se desvelan polipéptidos de fusión que comprenden el ligando modificado y un primer miembro de fusión en donde el primer miembro de fusión del ligando modificado proviene de toda o de una parte de una proteína con determinantes de unión al receptor diana, por ejemplo, como en el caso de una proteína o dominio que es un componente del complejo multimérico de señalización natural, y el primer miembro de fusión impide estéricamente el ensamblaje del complejo de señalización completo, actuando de este modo como un antagonista.

Los ligandos modificados mediante permutación circular que comprenden los polipéptidos de fusión incluyen proteínas solubles cuya unión a los receptores de superficie celular inician una cascada de señalización o sirven como reguladores negativos naturales de una cascada de señalización (por ejemplo, antagonistas), que incluyen, pero sin limitación, citocinas, quimiocinas, adipocinas, factores de crecimiento, hormonas, receptores solubles, proteínas de unión a citocina (por ejemplo, IL-18bp).

Los ligandos preferidos y las proteínas modificadas mediante permutación circular que comprenden los polipéptidos de fusión incluyen proteínas del conjunto de hélices y citocinas (incluyendo, pero sin limitación, hormona de crecimiento, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-22, IL-23p19, IL-11, IL-13, IL-15, IL-12p35, IL-21, IL-30 (IL27p28), IL-34, IL-35, IL-35p35, IFN- β , IFN γ , LIF, CNTF, oncostatina M, CLCF-1, GCSF, GM-CSF, EPO, ferritina, leptina, lactógeno placentario, prolactina, apolipoproteína e), proteínas b-trefoil (incluyendo, pero sin limitación, IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL18, IL-33, IL-36Ra, IL-36a, IL-36b, IL-36g, IL-37, IL-38, IL1Hy2, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8a, FGF-8b, FGF-8e, FGF-8f, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-22, FGF-23), proteínas de barril α/β (TIM) (incluyendo, pero sin limitación, triosafosfato isomerasa), proteínas beta tipo sándwich (incluyendo, pero sin limitación, galectina-1, galectina-3, TNF-beta, proteínas de siete hélices β , dominio $\alpha 1\alpha 2$ del MHC de clase 1, dominio I de integrina, dominio GYF, dominio C1, dominio C2 (por ejemplo, de cPLA2, PKC, sinaptotagmina), dominios de PDZ, C3d, C5a.

El ligando modificado mediante permutación circular que comprende los polipéptidos de fusión se selecciona lo más preferentemente de IL-6, IL-2, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, FGF-19, FGF-21, FGF-23.

Los ligandos modificados mediante permutación circular que comprenden los polipéptidos de fusión pueden tener especificidad de unión por un receptor, o por un receptor que se une a un ligando natural en la siguiente lista: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos 10, ligando de FLT3, Fractalkina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, insulina, IFN-γ, IGF-I, IGF-II, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina α, Inhibina β, IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos 2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atrayente de monocitos, M-CSF, MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, factor inhibidor de progenitor mielóide 1 (MIPF-1), NAP-2, Neurturina, factor de crecimiento nervioso, β-NGF, NT-3, NT-4, oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1α, SDF1β, SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF-α, TGF-β, TGF-β2, TGF-β3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF-α, TNF-β, receptor I de TNF, receptor II de TNF, TNIL-1, TPO, VEGF, receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, receptor 3 de VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-β, GRO-γ, HCC1, 1-309, HER1, HER2, HER3 y HER4.

Los receptores adicionales para los que el ligando modificado puede tener especificidad de unión incluyen los receptores en la siguiente lista, o un receptor que se une a un ligando natural incluido en la siguiente lista: EpoR, sitio de reconocimiento de TACE, TNF BP-I, TNF BP-II, IL-1R1, IL-6R, IL-10R, IL-18R, IL-1, IL-19, IL-20, IL-21, IL-23, IL-24, IL-25, IL-27, IFN-γ, IFN-α/β, CD4, CD89, CD19, HLA-DR, CD38, CD138, CD33, CD56, CEA y receptor de VEGF.

Los receptores adicionales para los que los ligandos modificados de los polipéptidos de fusión pueden tener especificidad de unión incluyen receptor peptídico liberador de gastrina, el receptor de neurotensina, el receptor de adrenomedulina, el receptor de histamina H2, el receptor de HCG, el receptor de MET, el receptor esfingosina 1-fosfato, CD126, CD213a1 y KDR, entre otros.

El ligando modificado de la proteína de fusión de polipéptidos puede tener especificidad de unión por un receptor que dimeriza tras la unión a un ligando natural (un receptor dímero) o un receptor que forma multímeros, tales como trímeros, tras la unión a un ligando natural (un receptor multimérico). Muchos receptores de citocina y receptores de factor de crecimiento, tales como miembros de la superfamilia del receptor de TNF (por ejemplo, TNFR1, TNFR2) y miembros de la familia del receptor de la tirosina cinasa (por ejemplo, EGFR, PDGFR, receptor de M-CDF (c-Fms)) forman dímeros o multímeros tras la unión de sus ligandos naturales. La superfamilia del receptor de TNF es un grupo de proteínas reconocido en la materia que incluye TNFR1 (p55, CD120a, p60, el miembro 1A de la superfamilia del receptor de TNF, TNFRSF1A), TNFR2 (p75, p80, CD120b, el miembro 1B de la superfamilia del receptor de TNF, TNFRSF1B), CD (TNFRSF3, LTβR, TNFR2-RP, TNFR-RP, TNFCR, TNF-R-III), OX40 (TNFRSF4, ACT35, TXGP1L), CD40 (TNFRSF5, p50, Bp50), Fas (CD95, TNFRSF6, APO-1, APTI), DcR3 (TNFRSF6B), CD27 (TNFRSF7, Tp55, S152), CD30 (TNFRSF8, Ki-1, D1S166E), CD137 (TNFRSF9, 4-1BB, I LA), TRAILR-1 (TNFRSF10A, DR4, Apo2), TRAILR-2 (TNFRSF10B, DR5, KILLER, TRICK2A, TRICKB), TRAILR3 (TNFRSF10C, DcR1, LIT, TRID), TRAILR4 (TNFRSF10D, DcR2, TRUNDD), RANK (TNFRSF11A), OPG (TNFRSF11B, OCIF, TR1), DR3 (TNFRSF12, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3), DR3L (TNFRSF12L), TAC1 (TNFRSF13B), BAFFR (TNFRSF13C), HVEM (TNFRSF14, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA), NGFR (TNFRSF16), BCMA (TNFRSF17, BCM), AITR (TNFRSF18, GTR), TNFRSF19, FLJ14993 (TNFRSF19L, RELT), DR6 (TNFRSF21), SOBa (TNFRSF22, Tnfrh2, 2810028K06Rik), y mSOB (THFRSF23, Tnfrh1). La familia del receptor de tirosina cinasa es un grupo de proteínas reconocido en la materia que incluye EGFR (ERBB1, HER1), PDGFR, c-Fms, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, receptor de insulina y receptores de factor de crecimiento de tipo insulina (IGF1R, IGF2R). Véase, Grassot et al., *Nucleic Acids Research*, 31(1):353-358 (2003).

El primer miembro de fusión de polipéptidos puede comprender todo o cualquier parte de los dominios extracelulares de los receptores naturales o proteínas accesorias para la hormona de crecimiento, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-22, IL-23, IL-30 (IL27p28), IL-34, IL-35, IFN-β, IFNγ, LIF, CNTF, oncostatina M, CLCF-1, GCSF, GM-CSF, EPO, lactógeno placentario, prolactina, apolipoproteína, IL-1α, IL-1β, IL-1Ra, IL18, IL-33, IL-36Ra, IL-36a, IL-36b, IL-36g, IL-37, IL1Hy2, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8a, FGF-8b, FGF-8e, FGF-8f, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-22, FGF-23, TNF-beta.

El miembro de fusión es preferentemente el dominio extracelular o un dominio del mismo seleccionado de gp130 (lo más preferentemente el dominio D1), IL-2Rα, IL-15Rα, IL-1RI, IL-1RII, IL-18Rα, IL-18Rβ, IL1RAcP, FGFR1b, FGFR1c, FGFR2b, FGFR2c, FGFR3b, FGFR3c, FGFR4, α-Klotho, and β-Klotho.

La proteína modificada mediante permutación circular que comprende los polipéptidos de fusión y el miembro de fusión se puede originar a partir de la misma proteína original de manera que la fusión genera un "homodímero" de cadena simple.

El miembro de fusión para el polipéptido permutado circularmente también puede requerir permutación circular para permitir la fusión. Por lo tanto, ambos miembros de la proteína de fusión pueden estar permutados circularmente, según sea necesario.

El miembro de fusión de polipéptidos puede proporcionar otras funciones o comportamientos nuevos o mejorados/potenciados para el polipéptido de fusión. Además, o como alternativa, se puede añadir un segundo miembro de fusión al polipéptido de fusión de la invención para proporcionar otras funciones o comportamientos nuevos y mejorados/potenciados al polipéptido de fusión de la invención. Por ejemplo, los miembros de fusión pueden proporcionar una semivida prolongada al polipéptido de fusión de la invención. La adición de miembros de fusión para prolongar *in vivo* la semivida es particularmente útil cuando el polipéptido de fusión de la invención es de un tamaño que se elimina rápidamente del cuerpo, lo que puede limitar el uso clínico.

Un polipéptido de la invención se puede modificar de tal manera que tenga un mayor tamaño hidrodinámico mediante, por ejemplo, el acoplamiento a polímeros o carbohidratos (tales como polietilenglicol (PEG), ácido colomínico o hidroxietilalmidón), la incorporación de sitios de N-glicosilación, o a través de miméticos de PEG recombinantes producidos mediante una secuencia larga y flexible de polipéptidos, tal como las descritas en el documento U.S. 2010/0239554 A1. El tamaño hidrodinámico de una proteína de fusión de polipéptidos de la invención se puede determinar usando métodos que son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de filtración en gel para determinar el tamaño hidrodinámico. Las matrices de filtración en gel adecuadas para la determinación de los tamaños hidrodinámicos de los ligandos, tales como matrices de agarosa reticulada, son bien conocidos y están fácilmente disponibles.

En una realización preferida, se diseña un polipéptido de fusión de la invención para incorporar un polipéptido de dominio de mucina tal como se describe en el documento USSN 61/657.264, titulado "Fusion Polypeptides Comprising an Active Protein Linked to a Mucin-Domain Polypeptide" presentado en la misma fecha del presente documento y con expediente de mandatario número 4000.3058 US.

En una realización, un polipéptido de fusión de la invención se puede fusionar a proteínas, dominios de proteínas o péptidos que mejoran la semivida sérica a través del reciclaje mediado por FcRn, incluyendo inmunoglobulinas, el dominio Fc de inmunoglobulinas (más notablemente IgG1 e IgG2), albúmina sérica, dominios de albúmina sérica (más notablemente DIII), péptidos con afinidad de unión a FcRn o proteínas o péptidos con afinidad de unión a inmunoglobulinas o albúmina sérica (tales como nanocuerpos).

Los métodos para el análisis farmacocinético y la determinación de la semivida del ligando serán familiares para los expertos en la materia. Los detalles se pueden encontrar en Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi y D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª Rev. ex edición (1982), que describe los parámetros farmacocinéticos tales como las semividas t_{α} y t_{β} y el área bajo la curva (ABC).

En una realización, un polipéptido de fusión de la invención se puede fusionar a proteínas, dominios de proteína o polipéptidos que se dirigen a (es decir, tienen afinidad por) órganos específicos, tejidos, células o matrices fisiológicas (tales como colágeno), carbohidratos o lípidos como un medio para localizar, distribuir o mantener el polipéptido de fusión de la invención en una región particular del cuerpo.

También se pueden incluir secuencias adicionales como parte del polipéptido de fusión tales como secuencias de marcadores de afinidad que se pueden proporcionar para facilitar la purificación o el aislamiento del polipéptido de fusión tal como las conocidas en la materia. También se pueden añadir secuencias de estabilidad al polipéptido de fusión para proteger la molécula de la degradación (por ejemplo, mediante una proteasa). Las secuencias de estabilidad adecuadas incluyen, pero sin limitación, moléculas de glicina incorporadas tras la metionina de iniciación (por ejemplo, MG (SEQ ID NO: 17), o MGG (SEQ ID NO: 18) para proteger la molécula de fusión de la ubiquitinación; dos prolinas incorporadas en el extremo C-terminal (que confieren protección contra la acción carboxipeptidasa) y similares.

Para probar la actividad biológica, la especificidad de unión y la afinidad de unión de un polipéptido de la invención, se puede usar un ensayo biológico apropiado. Los ensayos para las actividades biológicas de diversos tipos son bien conocidos para los expertos en la materia. El ensayo particular depende de la actividad particular de la molécula.

Preparación de proteínas permutadas circularmente

Las proteínas permutadas circularmente se pueden preparar mediante una serie de medios conocidos para los expertos en la materia. Estos incluyen síntesis química, modificación de proteínas existentes y expresión de proteínas permutadas circularmente usando metodología del ADN recombinante.

Cuando la proteína es relativamente corta (es decir, menos de aproximadamente 50 aminoácidos) la proteína permutada circularmente se puede sintetizar usando técnicas convencionales de síntesis química de péptidos. Si el enlazador es un péptido, se puede incorporar durante la síntesis. Si el enlazador no es un péptido, se puede acoplar al péptido tras la síntesis. La síntesis de fase sólida en la que el aminoácido de C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido por la adición de los aminoácidos restantes en la secuencia es el método preferido para la síntesis química de los ligandos permutados circularmente y las proteínas de fusión de la presente invención. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen por Barany y Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 en The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield,

et al. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963), y Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

5 Como alternativa, la proteína permutada circularmente se puede preparar mediante modificación química de una proteína natural. En general, esto requiere hacer reaccionar la proteína natural en presencia del enlazador para formar enlaces covalentes entre el enlazador y los extremos carboxilo y amino de la proteína, formando de este modo una proteína circular. Los nuevos extremos se forman entonces mediante la apertura del enlace peptídico que une los aminoácidos en otra localización. Esto se puede realizar por vía química o enzimática usando, por ejemplo, una peptidasa.

10 En una realización preferida, la proteína permutada circularmente o los polipéptidos de fusión que comprenden la proteína permutada circularmente fusionada a al menos un miembro de fusión, se sintetizará usando la metodología del ADN recombinante. Generalmente, esto implica la creación de una secuencia de ADN que codifica el ligando permutado circularmente (o el polipéptido de fusión completo que contiene el ligando permutado circularmente y el miembro de fusión), colocar el ADN en un vector de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar la proteína en un hospedador, aislar la proteína expresada y, si es necesario, renaturalizar la proteína.

15 El ADN que codifica el ligando permutado circularmente se puede producir mediante síntesis génica, o usando métodos de amplificación de ADN, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Se puede añadir opcionalmente ADN que codifica una secuencia señal de manera que la proteína de fusión permutada circularmente y procesada de manera apropiada se secrete a partir de la célula.

20 Un experto en la materia apreciará que el ligando permutado circularmente y la otra molécula que comprende los polipéptidos de fusión de la invención se pueden unir entre sí en cualquier orden. Por tanto, la segunda molécula se une preferentemente bien al extremo amino (fusión en N-terminal) o al extremo carboxilo (fusión en C-terminal) del ligando permutado circularmente.

25 Los ligandos permutados circularmente y sus proteínas de fusión se pueden expresar en una variedad de células hospedadoras, incluyendo E. coli, otros hospedadores bacterianos, levaduras y diversas células eucariotas mayores tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y las líneas de las células de mieloma. El gen de proteína recombinante se unirá de manera operativa a las secuencias de control de expresión apropiadas para cada hospedador. Para E. coli, ésta incluye un promotor tal como los promotores T7, trp o lambda, un sitio de unión a ribosomas y preferentemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control incluirán un promotor y preferentemente un potenciador que proviene de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación, y puede incluir secuencias donadoras y receptoras de empalmes.

30 Los plásmidos de la invención se pueden transferir (transfectar) a la célula hospedadora elegida mediante métodos bien conocidos tales como la transformación de cloruro de calcio para E. coli y el tratamiento de fosfato cálcico, electroporación, tratamiento de lipofectamina o tratamiento PEI para células de mamífero. Las células transformadas mediante los plásmidos se pueden seleccionar por resistencia a los antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes amp, gpt, neo y hyg.

35 Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad, cromatografía en columna con resinas iónicas o hidrofóbicas, electroforesis en gel y similares (véase, en general, R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y. (1990)). Las composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95 % de pureza son preferidas, y una pureza del 98 al 99 % o mayor son las más preferidas para usos farmacéuticos. Una vez purificados, los polipéptidos se pueden ensayar en modelos preclínicos, ensayar clínicamente o usar terapéuticamente.

40 Un experto en la materia reconocerá que se pueden hacer modificaciones a la secuencia de proteína circularizada sin reducir su actividad biológica. Se pueden hacer algunas modificaciones para facilitar la clonación, la expresión o la incorporación del ligando permutado circularmente en una proteína de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, la adición de restos, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación u aminoácidos adicionales colocados sobre cualquiera de los extremos para proteger la proteína de exopeptidasas. Por ejemplo, la IL6 permutada circularmente puede tener opcionalmente un codón de metionina adicional (Met) en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación para la traducción.

45 Un experto en la materia reconocerá que se pueden hacer otras modificaciones. Por tanto, por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos que aumenten la especificidad o la afinidad de unión de la proteína permutada circularmente, etc. Como alternativa, las regiones no esenciales de la molécula se pueden acortar o eliminar por completo. Por tanto, cuando hay regiones de la molécula que no están implicadas en sí en la actividad de la

molécula, se pueden eliminar o sustituir con segmentos más cortos que simplemente sirven para mantener las correctas relaciones espaciales entre los componentes activos de la molécula.

5 Las dos proteínas se pueden fusionar entre sí directamente o unirse por medio de un espaciador peptídico. El espaciador peptídico puede oscilar desde aproximadamente 1 a 40 restos de longitud. En una realización preferida, el espaciador peptídico es de 2 nm (20 Å) o menos de longitud.

10 En general, el espaciador no tiene actividad biológica en sí y funciona solo para unir y proporcionar alguna distancia entre las dos proteínas activas que comprenden la proteína de fusión. Sin embargo, un experto en la materia reconocerá que los restos del espaciador se pueden elegir para optimizar una propiedad de la proteína de fusión. Por ejemplo, un espaciador que contiene restos polares o cargados en el espaciador puede potenciar la solubilidad en soluciones acuosas. De manera similar, los restos del espaciador se pueden elegir para su efecto sobre el plegamiento de la proteína de fusión.

15 Se entiende que la invención incluye los ácidos nucleicos descritos anteriormente que codifican los polipéptidos de fusión de las invenciones tales como ácidos nucleicos recombinantes producidos mediante metodología del ADN recombinante, así como vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos de la invención y células hospedadoras que comprenden los vectores de la invención.

20 Usos terapéuticos

25 Los polipéptidos de fusión de la invención descritos en el presente documento son particularmente muy adecuados como agentes terapéuticos que se dirigen a células de interés *in vivo* (es decir, células diana) dado que presentan, entre otras propiedades, mayores afinidades de unión por receptores naturales que los ligandos naturales y actividades agonistas y antagonistas. Por tanto, las composiciones y las composiciones farmacéuticas que contienen los presentes polipéptidos de fusión se pueden administrar a un paciente que necesite tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, los polipéptidos de fusión de la invención que comprenden ligandos permutados circularmente, y diversas composiciones que contienen estas moléculas se administran a un paciente que padece una enfermedad o trastorno en una cantidad terapéuticamente eficaz.

30 La invención proporciona composiciones que comprenden los polipéptidos de fusión de la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y métodos terapéuticos y de diagnóstico que emplean los ligandos o composiciones de la invención.

35 Los usos terapéuticos o profilácticos de ligandos de la invención implican la administración de ligandos de acuerdo con la invención a un receptor mamífero, tal como un ser humano. Los polipéptidos de fusión de la invención preferentemente se unen a dianas con alta afinidad y/o aidez. Los ligandos sustancialmente puros de al menos 90 a 95 % de homogeneidad son preferidos para la administración a un mamífero, y del 98 al 99 % o más de homogeneidad es lo más preferido para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, de forma parcial o hasta la homogeneidad tal como se desee, los polipéptidos de fusión de la invención se pueden usar como diagnóstico o terapéuticamente (incluyendo de manera extracorpórea) o en el desarrollo y la realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares.

45 Por ejemplo, los polipéptidos de fusión de la presente invención típicamente encontrarán su uso en la prevención, en la supresión o en el tratamiento de estados de enfermedad. Por ejemplo, los polipéptidos de fusión se pueden administrar para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad o trastorno provocada por una actividad del receptor o caracterizada por la expresión o sobreexpresión del receptor, tal como inflamación crónica o enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas (por ejemplo, obesidad, diabetes de tipo II, síndrome metabólico), enfermedades respiratorias (por ejemplo, asma, EPOC), enfermedades oftálmicas (por ejemplo, DMAE, glaucoma), trastornos hematopoiéticos, inmunosupresión, rechazo a los trasplantes de órganos, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades del hueso y del cartílago (osteoporosis, artrosis), hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica, trastornos autoinmunes (que incluyen, pero sin limitación, diabetes de tipo I, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, espondiloartropatía (por ejemplo, espondilitis anquilosante), trastornos autoinflamatorios, lupus eritematoso sistémico, enteropatía inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), miastenia grave y síndrome de Behcet), psoriasis, endometriosis y bridas abdominales (por ejemplo tras cirugía abdominal).

60 Una aplicación preferida es, a través del uso de IL2 permutada circularmente fusionada a IL-2R α generando un IL-2 superagonista), el tratamiento de cáncer o de afecciones autoinmunes tales como la enfermedad de injerto frente a hospedador, o el rechazo a los trasplantes de órganos.

65 Se puede usar una IL-6 permutada circularmente fusionada al dominio D1 de gp130 (que genera un antagonista de IL-6 muy potente) en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes (que incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Crohn, enteropatía inflamatoria), cáncer (que incluye mieloma múltiple), y enfermedad de Castleman. Tal como se describe en los ejemplos de referencia 2 y 3, la proteína de fusión ligando-gp130 permutada circularmente

(RDB1527) presenta mayor afinidad de unión específica al receptor de IL6 natural (Figs. 6A frente a 6C) e inhibición de células diana (FIG. 5) en comparación con los ligandos naturales. La elevada afinidad de unión y la inhibición del crecimiento de los polipéptidos de fusión IL6-gp130 permutados circularmente pueden permitir que se administren estas proteínas a dosis más bajas en comparación con otros inhibidores de señalización de IL6, mientras se logra la misma eficacia terapéutica. Como alternativa, la administración a las mismas dosificaciones da como resultado una eficacia terapéutica prolongada, ya que las proteínas de fusión se deben eliminar desde la circulación a una concentración más baja antes de que dejen de presentar una eficacia significativa. Además, la elevada eficacia terapéutica no se acompaña de un aumento de efectos secundarios indeseables debidos a uniones no específicas y a citotoxicidad.

Una IL-1 permutada circularmente fusionada a un dominio de cualquiera de IL-1RI, IL-1RII o IL-1RAcP (que genera un antagonista muy potente de IL-1) se puede usar en el tratamiento de enfermedades autoinflamatorias, diabetes de tipo I, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes (que incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Crohn, enteropatía inflamatoria), cáncer, gota y artrosis.

Una IL-15 permutada circularmente fusionada a IL-15 α (que genera un superagonista de IL-15) se puede usar en el tratamiento de cáncer, de afecciones autoinmunes tales como la enfermedad de injerto frente a hospedador, el rechazo a los trasplantes de órganos o de infección.

La parte de ligando permutado circularmente del polipéptido de fusión se elige de acuerdo con el uso que se pretende. Las proteínas que pueden servir como dianas para los ligandos permutados circularmente incluyen pero no se limitan a moléculas de señalización tales como factores de crecimiento o fragmentos biológicamente activos o mutantes de los mismos. Por ejemplo, el factor de crecimiento puede ser una citocina (por ejemplo, una interleucina o quimiocina). Aunque un experto en la materia puede determinar fácilmente si una molécula es una molécula de señalización (es decir, si se produce y se secreta por un primer tipo celular y ejerce un efecto sobre sí misma (autocrina) o sobre un segundo tipo celular (paracrina), normalmente mediante la unión específica a un receptor), varias moléculas particulares de señalización pueden colocarse adecuadamente en dos o más categorías. Por ejemplo, IL-1 puede denominarse apropiadamente como una citocina o interleucina y la eritropoietina se puede denominar apropiadamente como un factor de crecimiento o una hormona; etc.

Una citocina incluye pero no se limita a, IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p35, IL-13, IL-15, miembros de la familia de la IL-17, IL18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-23p19, IL-30 (IL27p28), IL-33, IL-34, IL-35, IL-35p35, IL-36Ra, IL-36a, IL-36b, IL-36g, IL-37, IL-38, LIF, CNTF, oncostatina M, CLCF-1, GCSF, GMCSF, ferritina, lactógeno placentario, apolipoproteína e, interferón alfa (IFN α), interferón beta (IFN β), o interferón gamma (IFN γ). Una quimiocina puede ser un miembro de la subfamilia α y/o se puede unir a un receptor CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 o CXCR5; puede ser un miembro de la subfamilia β y/o se puede unir a una molécula CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 o CCR11. Una quimiocina también puede ser linfotactina u otra quimiocina que se una a un receptor CXCR1; una quimiocina también puede ser fractalkina o se puede unir a un receptor CX₃CR1. Por ejemplo, la quimiocina puede ser CCL7, CCL23, CCL27, CCL28, CXCL12, CXCL14 o CXCL15.

Los factores de crecimiento incluyen pero no se limitan a miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), miembros de la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF), miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF), miembros de la familia GDF, miembros de la familia BMP, miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)(incluyendo FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8a, FGF-8b, FGF-8e, FGF-8f, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-22, FGF-23, miembros de la familia del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDFG). Por ejemplo, el factor de crecimiento puede ser TNF, EGF, TGF α , TGF β , FGF, NGF, eritropoietina, IGF-1 o IGF-2.

Una hormona puede ser una hormona producida por la glándula suprarrenal, la glándula paratiroides, la glándula hipófisis o la glándula tiroidea; también se puede producir por el hipotálamo, el ovario, el testículo, el páncreas, la glándula pineal o el timo. Por ejemplo, la hormona puede ser una hormona estimulante de tiroidea, una hormona estimulante de folículos, una hormona leuteinizante, prolactina, hormona de crecimiento, hormona adrenocorticotrópica, hormonas antidiuréticas, oxitocina, hormona liberadora de tirotrópica, hormona liberadora de gonadotropina, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, hormona liberadora de corticotropina, somatostatina, dopamina, melatonina, tiroxina, calcitonina, hormona paratiroidea, un glucocorticoide, un mineralocorticoide, un andrógeno, adrenalina, un estrógeno, progesterona, gonadotropina coriónica humana, insulina, glucagones, somatostatina, eritropoietina, calcitriol, péptido natriurético auricular, gastrina, secretina, colecistoquinina, somatostatina, neuropéptido Y, ghrelina, PYY₃₋₃₆, factor de crecimiento de tipo insulina 1, angiotensinógeno, trombopoietina o leptina.

Los neurotransmisores incluyen acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina, histamina o epinefrina. El neurotransmisor también puede ser un péptido neuroactivo (por ejemplo, bradiquinina, colecistoquinina, gastrina,

secretina, oxitocina, un péptido del sueño, hormona liberadora de gonadotropina, beta-endorfina, encefalina, sustancia P, somatostatina, prolactina, galanina, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, bombesina, dinorfina, neurotensina, motilina, tiotropina, neuropéptido Y, hormona leuteinizante, calcitonina o péptido intestinal vasoactivo). Las moléculas coestimuladoras adecuadas incluyen B7-1 y B7-2.

5

Composiciones Farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión de la invención y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante las cuales el polipéptido se combina con un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, tal como soluciones acuosas o tampones, suspensiones y emulsiones farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propiltilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales. Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales, tal como se describe en Pharmaceutical Sciences de Remington, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

10

15

20

Más particularmente, las presentes composiciones farmacéuticas se pueden administrar para terapia mediante cualquier ruta adecuada incluyendo subcutánea, subcutánea o intratecal mediante bomba de infusión, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intravítrea, nasal y pulmonar. También se apreciará que la ruta preferida variará con el agente terapéutico, con la afección y con la edad del receptor, y la enfermedad que se esté tratando.

25

En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En esta realización, la composición se puede suministrar como un polvo liofilizado que se reconstituye antes de la administración. La composición también se puede suministrar en una forma líquida, que se puede administrar directamente al paciente. En una realización, la composición se suministra como un líquido en una jeringa precargada de manera que el paciente se pueda autoadministrar la composición.

30

35

En otra realización, las composiciones de la presente invención están encapsuladas en liposomas, que tienen una utilidad demostrada en la administración de agentes activos beneficiosos de forma controlada durante períodos de tiempo prolongados. Los liposomas son membranas de bicapa encerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas también pueden ser vesículas unilamelares que poseen una única bicapa de membrana o vesículas multilamelares con múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa. La estructura de la bicapa de membrana resultante es tal que las colas hidrófobas (no polares) del lípido se orientan hacia el centro de la bicapa, mientras que las cabezas hidrófilas (polares) se orientan hacia la fase acuosa. En una realización, el liposoma puede estar recubierto con un polímero flexible soluble en agua que evita la absorción por los órganos del sistema de fagocitos mononucleares, principalmente el hígado y el bazo. Los polímeros hidrófilos adecuados para rodear a los liposomas incluyen, sin limitación, PEG, polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropilmetacrilato, polihidroxetilacrilato, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol, poliaspartamida y secuencias de péptidos hidrófilos tal como se describen en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.316.024; 6.126.966; 6.056.973 y 6.043.094.

45

50

55

Los liposomas pueden estar comprendidos por cualquier lípido o combinación de lípidos conocida en la materia. Por ejemplo, los lípidos formadores de vesículas pueden ser lípidos de origen natural o sintéticos, incluyendo fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y esfingomielina tal como se desvela en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.056.973 y 5.874.104. Los lípidos formadores de vesículas también pueden ser glucolípidos, cerebrósidos o lípidos catiónicos, tales como 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamino) propano (DOTAP); bromuro de N-[1-(2,3,-ditetradeciloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE); bromuro de N-[1-(2,3,-dioleiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxi etilamonio (DORIE); cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); 3 [N-(N',N'-dimetilaminoetano) carbamoil] colesterol (DC-Chol); o dimetildioctadecilamonio (DDAB) también tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos N.º 6.056.973. El colesterol también puede estar presente en el intervalo apropiado para impartir estabilidad a la vesícula tal como se desvela en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.916.588 y 5.874.104.

60

Para las formulaciones líquidas, una propiedad deseada es que la formulación se suministre en una forma que pueda pasar a través de una aguja de calibre 25, 28, 30, 31, 32 para administración intravenosa, intraarticular o subcutánea.

65

En otras realizaciones, la composición puede administrarse por vía intranasal para permitir la transferencia de los agentes activos a través de los conductos olfativos hacia el SNC y reducir la administración sistémica. Los dispositivos usados comúnmente para esta vía de administración se incluyen en la Patente de Estados Unidos N.º 6.715.485. Las composiciones administradas a través de esta ruta pueden permitir una mayor dosificación del SNC o una carga corporal total reducida, lo que reduce los riesgos de toxicidad sistémica asociados con ciertos fármacos. La preparación de una composición farmacéutica para la administración a un dispositivo implantable en subdermis

se puede realizar usando métodos conocidos en la materia, tales como los descritos en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 3.992.518; 5.660.848; y 5.756.115.

5 Una composición farmacéutica típica para administración parenteral sería de aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg por paciente por día. Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en publicaciones tales como Pharmaceutical Science de Remington, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

10 Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones se pueden administrar dependiendo de la dosificación y frecuencia tal como se requiera y se tolere por el paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cantidad suficiente de las proteínas de la presente invención para tratar eficazmente al paciente.

Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y de ningún modo se deben interpretar como limitantes de la invención que se reivindica.

Ejemplo de referencia 1. Diseño, preparación, expresión y purificación de construcciones de fusión Picasso

20 *1. Diseño de IL-6 permutada circularmente y fusión al dominio D1 del receptor gp130*

La estructura cristalina del complejo hexamérico de señalización IL-6 (1P9M.pdb; FIG. 1) se utilizó para diseñar una variante permutada circularmente de la IL6 humana, llamada picasso3 (FIG. 2; RDB1503; SEQ ID NO: 1 (proteína) y SEQ ID NO: 2 (ácido nucleico)), de manera que el extremo C-terminal diseñado se pudiese fusionar al extremo N-terminal del dominio D1 de gp130 en el complejo a través de un espaciador corto. En resumen, los extremos N-terminal y C-terminal diseñados en picasso3 se corresponden con los restos 182 y 180 en la IL-6 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3) y los extremos de IL-6 natural se unieron a través de un enlazador de 7 aminoácidos. El dominio D1 de gp130 se eligió como el miembro de fusión de manera que no solo interferiría estéricamente con la formación del hexámero, sino que también potenciaría la afinidad de unión a IL-6R a través de interacciones naturales presentes en el complejo (FIG. 3B). El extremo C-terminal diseñado de picasso3 se fusionó al dominio D1 a través de un espaciador de dos aminoácidos para formar RDB1527 (FIG. 3B; SEQ ID NO: 4 (proteína) y SEQ ID NO: 5 (ácido nucleico)). Como control se diseñó un análogo de proteína de fusión que consistía en una IL6 natural fusionada a D1 (RDB1529) (FIG. 3A; SEQ ID NO: 6 (proteína) y SEQ ID NO: 7 (ácido nucleico)).

35 *2. Síntesis génica*

La síntesis de los genes para la expresión de las construcciones diseñadas se llevó a cabo usando métodos convencionales.

40 *3. Subclonación de los genes sintetizados en un vector de expresión en mamíferos*

A) Preparación del vector de expresión pcDNA™ (Invitrogen).

Se digirieron 5 µg de pcDNA con BamHI y HindIII durante dos horas a 37 °C. El digerido se trató con fosfatasa alcalina de ternera para eliminar el 5' fosfato, evitando de este modo el religamiento del vector sobre sí mismo. Se intercambió el tampón para eliminar sales de la reacción de fosfatasa alcalina de ternera. El kit de limpieza de PCR de Qiagen se usó siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN se eluyó en 30 µl de H₂O.

50 B) Preparación del gen de interés.

El gen de interés se digirió con BamHI y HindIII durante dos horas a 37 °C. La reacción de digestión se dejó correr sobre un aparato E-Gel® CloneWell™ (Invitrogen) usando SYBR Green al 0,8 %. El fragmento correspondiente al gen de interés se aisló de la segunda fila de pocillos en el gel.

55 C) Reacción de ligamiento del gen a pcDNA.

El pcDNA preparado (etapa A) se mezcló con el ADN de la etapa B en presencia de ligasa T4 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras el ligamiento, los productos se transformaron en células TOP10 (Invitrogen; cepa químicamente competente de *E. coli*) y el clon correcto se tomó y se almacenó como un reservorio en glicerol a -80 °C.

60 *4. Expresión de RDB1503, RDB1527 y RDB1529*

Todas las proteínas se expresaron en células CHO usando el reactivo FreeStyle™ Max Reagent (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, un día antes de la transfección, las células se sembraron a 0,5x10⁶ célula/ml y en el día de la transfección se ajustaron a 1x10⁶ células/ml tal como se recomienda por el

fabricante. Para una transfección de 1 litro, se prepararon dos tubos (A y B) de medio (OptiPRO™, Invitrogen) que contenían aproximadamente 19 ml, se añadió 1 mg de ADN al tubo A y se añadió 1 ml de reactivo FreeStyle™ Max al tubo B. Inmediatamente, los contenidos de ambos tubos se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras el período de incubación se añadió lentamente la mezcla a 1 litro de células CHO. Tras la transfección se dejaron las células durante 6 a 7 días y después se recogió el sobrenadante.

5. Purificación de RDB1527 y RDB1529

La proteína expresada en el sobrenadante se capturó en una columna de proteína A para unir la porción Fc de la proteína de fusión. Tras la unión de la proteína, la columna se lavó con hasta 5 volúmenes de columna de PBS. La proteína se eluyó de la columna disminuyendo el pH del tampón de funcionamiento y se neutralizó directamente con tampón Tris a pH=7. La proteína purificada se dializó toda la noche frente a PBS.

Ejemplo de referencia 2. Actividad *in vitro* de proteínas de fusión de IL6 permutadas circularmente

Las células HEK-Blue™ IL-6 (Invitrogen) son células embrionarias humanas diseñadas específicamente para detectar IL-6 bioactiva *in vitro* mediante el control de la expresión inducida por IL-6 de un gen reportero de fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible con STAT3 (SEAP). SEAP se puede controlar fácilmente cuando se usa el medio de detección de SEAP QUANTI-Blue™ (Invitrogen). La línea celular humana y el medio de detección se usaron para ensayar la capacidad de la IL6 permutada circularmente y de las construcciones de proteína de fusión IL6 RDB1503, RD1527 y RDB1529 para actuar como agonistas o antagonistas de SEAP inducida por IL-6.

Se colocaron 100 µl de medio que contiene células HEK-Blue™ IL-6 en placas de microtítulo de 96 pocillos hasta una concentración final de 50.000 células/pocillo. Para medir la actividad agonista, se prepararon IL6 y RDB1503 a una concentración final de 200 pM y después se diluyeron de manera seriada y se añadieron por duplicado muestras de ensayo a las células HEK-Blue™ IL-6. Para medir la potencia del antagonista, se prepararon RD1527 y RDB1529 a una concentración inicial de 3,3 nM, después se diluyeron de manera seriada y se añadieron en duplicado muestras de ensayo a las células HEK-Blue™ IL-6 en presencia de una concentración constante de IL6 de 12,5 pM. Las muestras se incubaron a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante 20-24 horas, después, se transfirieron 40 µl de cada muestra a una nueva placa de 96 pocillos que contiene 160 µl de QUANTI-Blue™ en cada pocillo, y se incubó a 37 °C, con CO₂ al 5 %. Se tomaron lecturas de absorbancia a 630 nm tras 3 horas de incubación.

La IL-6 permutada circularmente (RDB1503) demostró actividad agonista con una CE₅₀ comparable con la de IL-6 (FIG. 4). RDB1527 (CP_IL-6_D1_Fc) fue capaz de inhibir la expresión de SEAP inducida por IL-6 en una forma dependiente de la dosis con un valor de CI₅₀ de 0,22 nM (FIG. 5). En contraste, RDB1529 (IL-6_D1_Fc no modificada) no presentó efecto antagonista (FIG. 5).

Se sacaron las siguientes conclusiones: 1) La permutación circular de IL-6 da como resultado que no haya pérdida de afinidad de unión; 2) la fusión del dominio D1 de gp130 al extremo C-terminal de la IL-6 de tipo silvestre no convierte a IL-6 en un potente agonista, mientras que la fusión del dominio D1 de gp130 al extremo C-terminal de la IL-6 permutada circularmente da como resultado un potente antagonismo de la señalización mediada por IL-6.

Ejemplo de referencia 3. Medidas de cinética de wtIL6, RDB1527 y RDB1529

La IL6-Fc de tipo silvestre (wtIL6), RDB1527 y RDB1529 se inmovilizaron en una microplaca de sensor de Biacore™ usando el kit de captura de anticuerpos humanos (GE Healthcare) según el protocolo del fabricante. IL-6R se pasó sobre la superficie de la microplaca en un modelo por etapas. IL-6R se preparó en 5 concentraciones; 3,0 nM, 1,0 nM, 0,33 nM, 0,11 nM y 0,03 nM. En el primer ciclo, la concentración de 0,03 nM de IL-6R fluyó sobre el ligando de unión en la superficie de la microplaca durante 180 segundos, tras los cuales, se pasó una solución de blanco sobre la superficie para permitir que se disociase IL-6R. Se repitió el mismo procedimiento durante cuatro veces adicionales usando una concentración en aumento desde 0,03 a 3 nM de 6R. Los sensogramas resultantes se analizaron con el programa informático de instrumento natural para calcular las afinidades de unión de las construcciones.

La afinidad de unión de RDB1527 a IL-6R se calculó que era 40 pM (FIG. 6C), representando un aumento de más de 200 veces cuando se compara con la afinidad del control wtIL6 (9 nM, FIG. 6A). El sensograma para RDB1529 (FIG. 6B) dio como resultado un mal ajuste y, por lo tanto la afinidad de unión calculada no es fiable. Esto puede deberse a una unión mixta entre IL-6 e IL-6R e independientemente de D1 e IL-6R.

Basándose en los resultados, se concluyó que la afinidad de unión de RDB1527 a IL-6R es de 40 pM o mayor de 200 veces superior a la de wtIL6. Estos datos, en combinación con la potente actividad antagonista, sugieren fuertemente que los determinantes de unión en IL-6 y en D1 se unen simultáneamente a IL-6R y evitan la asociación del complejo de señalización, tal como se diseñó.

Ejemplo de referencia 4. Diseño de IL1 β permutada circularmente y fusionada a los dominios D1-D2 de IL-1RI (RDB1538)

La estructura cristalina del complejo heterotrimérico de señalización IL-1 β (4DEP.pdb; FIG. 7A) se utilizó para diseñar una variante permutada circularmente de IL-1 β (RDB1515; SEQ ID NO: 8 (proteína) y SEQ ID NO: 9 (ácido nucleico)), de manera que el extremo N-terminal diseñado se pudiese fusionar al extremo C-terminal del dominio D1-D2 de IL-1RI a través de un espaciador corto. En resumen, los extremos N-terminal y C-terminal diseñados se corresponden con los restos 224 y 223, respectivamente, en IL-1 β de tipo silvestre, y los extremos naturales de IL-1 β estaban unidos mediante un enlazador de 7 aminoácidos. El extremo N-terminal recién creado se fusionó al dominio D1-D2 de RI con un espaciador de 5 aminoácidos y se añadió el marcador FLAG al extremo N-terminal de RI, dando como resultado RDB1538 (FIG. 7B; SEQ ID NO: 10 (proteína) y SEQ ID NO: 11 (ácido nucleico)). La proteína de fusión resultante se diseña para ser un antagonista de la señalización mediada por IL-1 β uniéndose a IL-1RAcP e impidiendo que se ensamble el complejo de señalización completo.

Ejemplo de referencia 5. Diseño de IL-2 permutada circularmente y fusionada a IL-2R α (RDB1405)

Tras unirse a IL-2R α , la conformación de unión de IL-2 se estabiliza para permitir que se forme un complejo de alta afinidad con IL-2R β y γ_c . RDB1405 está diseñada para ser un superagonista de la señalización mediada por IL-2, particularmente en células que carecen de IL-2R α , ya que sería capaz de formar el complejo de alta afinidad sin requerir la unión a IL-2R α asociado a células. La estructura cristalina del complejo cuaternario de señalización de IL-2 (2B5l.pdb; FIG. 8A) se utilizó para diseñar una variante de IL-2 permutada circularmente, de manera que el extremo C-terminal diseñado se pudiese fusionar al extremo N-terminal de IL-2R α a través de un espaciador corto. En resumen, los extremos N-terminal y C-terminal diseñados se corresponden con los restos 95 y 94, respectivamente, en IL-2 de tipo silvestre. El extremo C-terminal de IL-2 natural estaba unido al resto 4 de la IL-2 a través de un enlazador de 2 aminoácidos. Finalmente, el extremo C-terminal recién creado estaba fusionado al extremo N-terminal de IL-2R α a través de un espaciador de 6 aminoácidos y el extremo C-terminal de IL-2R α estaba fusionado a Fc de IgG1 humana, dando como resultado RDB1405 (FIG. 8B; SEQ ID NO: 12 (proteína) y SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico)).

Ejemplo 1. Diseño de proteínas de fusión permutadas circularmente

Se diseñó una proteína de fusión de IL-2 o IL-15 con selectividad mejorada por células que expresan IL-2R $\beta\gamma$ (pero no IL-2 α) sobre células que expresan IL-2R $\alpha\beta\gamma$ en relación con la IL-2 de tipo silvestre (IL-2 de tipo silvestre tiene una mayor preferencia por células que expresan IL-2R $\alpha\beta\gamma$). Al fusionar IL-2R α a IL-2 o IL-15Ra a IL-15, la proteína de fusión resultante tenía una mayor actividad sobre células que carecen de la respectiva cadena alfa (IL-2R α o IL-15R α) en comparación con el ligando natural, y se reduciría la preferencia por células que expresan la respectiva cadena alfa. Por tanto, el radio de actividad, CE₅₀ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$)/CE₅₀(IL-2R α IL-2R $\beta\gamma$) aumentaría para las proteínas de fusión CP-IL-2-IL-2R α , sería menor en comparación con la IL-2 de tipo silvestre. Se podrían esperar resultados análogos para las proteínas de fusión CP-IL-15-IL-15R α . Se requiere la permutación circular de la citocina para orientar de manera apropiada los extremos en una localización óptima para la fusión, ya que los extremos nativos están orientados distalmente a las cadenas alfa en el complejo de señalización.

Resultados: En células que carecen de IL-2R α , pero que expresan IL-2R $\beta\gamma$ (línea celular HH)¹, las construcciones diseñadas son tan eficaces (de hecho, de dos a cinco veces mejor) como la proleucina en la promoción de la fosforilación de STAT5 (Figura 11A, panel izquierdo). En contraste, en una línea celular que expresa el complejo receptor heterotrimérico de alta afinidad, IL-2R $\alpha\beta\gamma$, (línea celular CTLL-2)², dos de las construcciones diseñadas (RDB1411, RDB1413) son de 100 a 300 veces menos activas que la proleucina tal como se mide mediante la proliferación celular. En su conjunto, las construcciones diseñadas presentan entre 400 y 600 veces mejor selectividad por células que carecen de IL-2R α , en relación con la IL-2 de tipo silvestre y, por lo tanto, tienen el potencial de administrar un perfil terapéutico mejorado. Aunque se ha observado el aumento en la proporción de actividad, tal como se esperaba, fue sorprendente, que el mayor efecto sobre el aumento en la proporción fuera la pérdida dramática de actividad (de 100 a 300 veces) en células que contienen IL-2R α , en lugar de una mejora en la actividad (solo 2 a 5 veces) para células que carecen de IL-2R α .

En células que carecen de IL-2R α , pero que expresan IL-2R $\beta\gamma$ (línea celular HH)¹, las construcciones diseñadas son potentes activadores de fosforilación de STAT5, pero aproximadamente 10 veces menos potentes que la IL-15 de tipo silvestre (Figura 12A, panel izquierdo). En una línea celular que expresa el complejo receptor heterotrimérico de alta afinidad, IL-2R $\alpha\beta\gamma$, (línea celular CTLL-2)², las construcciones diseñadas (RDB1408, RDB1416) son de 2000 a 6000 veces menos activas que la IL-15 de tipo silvestre tal como se mide mediante la proliferación celular. En su conjunto, las construcciones diseñadas presentan entre 200 y 600 veces mejor selectividad por células que carecen de IL-2R α , en relación con la IL-15 de tipo silvestre. Aunque se ha observado el aumento en la proporción de actividad, tal como se esperaba, fue sorprendente, que el mayor efecto sobre el aumento en la proporción fuera la pérdida dramática de actividad (de 2000 a 6000 veces) en células que contienen IL-2R α y que se observe una pérdida de actividad de 10 veces para células que carecen de IL-2R α .

¹ATCC CRL-2105²ATCC TIB-214

Construcciones:

5 RDB1409: CP-IL-2(C145S)-FLAG; IL-2 permutada circularmente. La mutación C145S es análoga a la de la proleucina (rhIL-2) para mejorar las propiedades físicas de la proteína. El marcador FLAG se añade para facilitar la purificación.

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSI
 ISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK
 KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQGS DYKDDDDK (SEQ ID NO: 24)

10 RDB1411: CP-IL-2(C145S)-IL-2R α -Fc; IL-2 permutada circularmente y fusionada a IL-2R α . La mutación C145S es análoga a la de la proleucina (rhIL-2) para mejorar las propiedades físicas de la proteína. El Fc se añade para facilitar la purificación.

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSI
 ISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK
 KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQGS GGGSEL CDDDPPEIPHATFKAMA
 YKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNT
 TKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYH
 FVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGGGGS
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)

15 RDB1413: CP-IL-2(C145S)-IL-2R α -FLAG; IL-2 permutada circularmente y fusionada a IL-2R α . La mutación C145S es análoga a la de la proleucina (rhIL-2) para mejorar las propiedades físicas de la proteína. El marcador FLAG se añade para facilitar la purificación. Construcción análoga a RDB1411, sustituyendo Fc con FLAG.

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSI
 ISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK
 KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQGS GGGSEL CDDDPPEIPHATFKAMA
 YKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNT
 TKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYH

 FVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGDYK
 DDDDK (SEQ ID NO: 26)

20 RDB1408: Fc-IL-15R α (sushi)-CP-IL-15; IL-15 permutada circularmente y fusionada al dominio sushi de IL-15R α . El Fc se añade para facilitar la purificación.

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSG
 FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDGGSELEEKNIKEFLQSFVHI
 VQMFINGGGSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCF
 LLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKEC (SEQ ID NO:
 27)

5 RDB1416: FLAG-IL-15R α (sushi)-CP-IL-15; IL-15 permutada circularmente y fusionada al dominio sushi de IL-15R α . El marcador FLAG se añade para facilitar la purificación. Construcción análoga a RDB1408, sustituyendo Fc con FLAG.

DYKDDDDKGSITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTE
 CVLNKATNVAHWTPSLKCIRDGGSELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINGGGSN
 WNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG
 DASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKEC (SEQ ID NO: 28)

10 Aunque la presente invención se ha mostrado y se ha descrito haciendo particular referencia a realizaciones preferentes de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles sin desviarse del alcance de la invención englobada en las reivindicaciones adjuntas. También se debería entender que las realizaciones descritas en el presente documento no son mutuamente excluyentes y que las características de las diversas realizaciones se pueden combinar en su totalidad o en parte de acuerdo con la invención.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ALKERMES, INC.
- 20 <120> LIGANDOS MODIFICADOS MEDIANTE PERMUTACIÓN CIRCULAR COMO AGONISTAS Y ANTAGONISTAS
- <130> 4000.3059 WO
- 25 <140>
- <141>
- <150> 61/778,575
- <151> 13/03/2013
- 30 <150> 61/778,812
- <151> 13/03/2013
- 35 <150> 61/723,081
- <151> 06/11/2012
- <150> 61/657,264
- <151> 08/06/2012
- 40 <150> 61/657,378
- <151> 08/06/2012

ES 2 675 568 T3

<150> 61/657,285
 <151> 08/06/2012

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 170

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

15

20

ES 2 675 568 T3

<210> 2
<211> 516
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 2

10

```
cagaaccagt ggotgcagga catgaccacc cacctgatcc tgcggtcctt caaagagttc      60
ctgcagtcct ccctgcgggc cctgagacag atgagcggag gatctggcgg aggctcctct      120
gagcgggatcg acaagcagat ccggtacatc ctggaaggca tctccgccct ggggaaagag      180
acatgcaaca agtccaacat gtgcgagtcc agcaaagagg ccctggccga gaacaacctg      240
aacctgcccc agatggotga gaaggacggc tgottccagt ccggcttcaa cgaagagact      300
tgcttggcca agatcatcac cggcctgctg gaatttgagg tgtacctgga atacctgcag      360
aacagattcg agtcctccga ggaacaggcc agagccgtgc agatgtccac caaggtgctg      420
atccagtttc tgcagaagaa ggccaagaac ctggacgcta tcaccacccc cgaccctacc      480
accaatgcct ccctgctgac caagctgcag tgataa                                516
```

<210> 3
<211> 212
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 3

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Met
 210

<210> 4
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 4

5

10

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser
 260 265 270
 Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 275 280 285
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 290 295 300
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 305 310 315 320
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 325 330 335
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 340 345 350
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 355 360 365
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 370 375 380
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 385 390 395 400
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 405 410 415
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 420 425 430
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 435 440 445
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 450 455 460
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 465 470 475 480
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 485 490 495
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500 505 510

ES 2 675 568 T3

<210> 5
 <211> 1539
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 5

10

```

caaaaccagt ggctccagga tatgaccacc cacctcatcc tcagaagttt caaggagttc      60
ctccagtcca gcoctgagggc tctgaggcaa atgagcggag gctccggcgg aggcagctcc      120
gagagaatcg acaagcagat caggtacatc ctcgatggca tcagcgcctt cagaaaagaa      180
acctgtaata agagcaacat gtgtgagagc agcaaggaag ccctcgccga gaacaatctg      240
aacctcccca aatggctga gaaggacgga tgcttccaga gcggttcaa tgaggagaca      300
tgctctgtga agatcatcac aggactcctg gagttcgaag tctacctgga gtacctocag      360
aacaggttcg aatccagoga ggaacaggct agggctgtgc agatgtccac caagggtgctg      420
atccagttcc tccagaagaa ggccaagaat ctggatgcca tcaccacacc cgatcctaca      480
accaacgcca gcoctgtgac caagctccag gcoctcgaac tcctggaccg ttgtggctac      540
atttcccctg aaagccctgt ggtgcaactc cacagcaatt tcacagcctg ctgtgtgctc      600
aaggagaagt gcatggacta ctttcacgtg aatgctaatt atatcgtgtg gaagacaaac      660
cacttcacca tcccaagga gcagtatacc atcatcaaca ggaccgcctc cagcgtgaca      720
ttcaccgaca tcgcttccct caacattcag ctgacctgca atatoctcac cttcggccag      780
ctggagcaga acgtgtaoag aatcaccatc attagcggcc tcgtocctag aggctccgaa      840
ccaagtccct ccgataaaaac ccatacctgc cccccttgcc ctgctcccga actcctcggc      900
ggccccagcg tgtttctctt ccctcccaag cccaaagata ccctgatgat cagcaggaca      960
cccgaagtca cctgcgtggt ggtcgacgtg tcccacgagg accccgaggt caaattcaac     1020
tggtacgtcg atggcgtgga ggtgcataat gctaagacca agcccagga ggagcagtac     1080
aactccacat acagggtggt ctccgtcctg accgtgctgc atcaagactg gctgaacggc     1140
aaggagtata agtgcaaggt gagcaataaa gccctccccg cccctattga gaagaccatt     1200
tccaaggcca agggccagcc tagagaacct caagtctaca cactcccccc ctccagggag     1260
gagatgacca aaaatcaggt ctccctgacc tgcttggtga agggctteta tcctagcgac     1320
atcgccgtcg agtgggagag caacggacag cccgagaaca actacaaaac cacacctccc     1380
gtgctcgaca gcgacggcag cttcttctct tactccaagc tcaccgtgga taagtccagg     1440
tggcagcaag gcaacgtggt tagctgcagc gtgatgcacg aagctctcca caaccactat     1500
accagaagt ccctcagcct cagccctggc aagtagtga
    
```

ES 2 675 568 T3

<210> 6
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr
 210 215 220
 Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala
 225 230 235 240
 Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu
 245 250 255
 Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Val Pro Arg
 260 265 270
 Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 275 280 285
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 290 295 300
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 305 310 315 320
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 325 330 335
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 340 345 350
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 355 360 365
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 370 375 380
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 405 410 415
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 420 425 430
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 435 440 445
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 450 455 460

ES 2 675 568 T3

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

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

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

5 <210> 7
 <211> 1524
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 7

```

ctgacctcca gcgaaaggat cgacaagcag atcaggtaca toctcgacgg catctccgct      60
ctcagaaagg agacctgcaa caagagcaac atgtgcgaga gcagcaagga agccctggct      120
gagaacaatc tcaacctgcc caagatggcc gaaaaggatg gatgcttoca gacgcgcttt      180
aacgaggaga cctgcctcgt gaagatcatc accggcctgc tcgagtttga ggtgtatctc      240
gagtacctgc agaataggtt cgagagcagc gaggaacagg ctagagctgt ccagatgtcc      300
accaaggtgc tgatccagtt cctgcaaaag aaggccaaga atctcgacgc tatcaccacc      360
cctgacccta ccacaaacgc cagcctgctg accaagctgc aggcccaaaa ccaatggctc      420
caggacatga caaccacct gatcctgagg agottcaagg agttcctoca atcctccctc      480
agggccctga gacagatgag cgaactgctc gacccttgtg gatacattag ccctgaatoc      540
cccgtgggtgc agctgcatag caatttcacc gccgtgtgcg tgctcaaaga gaagtgcattg      600
gactacttcc atgtgaacgc caactacatc gtgtggaaga ccaaccattt caccatcccc      660
aaggagcaat acaccatcat caacagaacc gccagcagcg tcacattcac cgacatcgcc      720
tcctgaaca tccaactgac atgcaacatt ctcaocttog gccagctgga gcaaaatgtg      780
tacggcatca ccatcattag cggcctcgtc octagaggct cogaacccaa gtctccgat      840
aaaaccata cctgcccccc ttgccctgct ccogaactoc toggcgggccc cagcgtgttt      900
ctcttcctc ccaagcccaa agatacctg atgatcagca ggacaccoga agtcacctgc      960
gtggtgggtcg acgtgtccca cgaggacccc gaggtcaaat tcaactggta cgtcgatggc     1020
gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagccc agggaggagc agtacaactc cacatacagg     1080
gtggtctccg tctgacctg gctgcatcaa gaotggotga acggcaagga gtataagtgc     1140
aaggtgagca ataaagccct ccccgccctc attgagaaga ccatttccaa ggccaagggc     1200
  
```

ES 2 675 568 T3

cagcctagag aacctcaagt ctacacactc cccccctcca gggaggagat gaccaaaaat 1260
 caggtctccc tgacctgcct ggtgaagggc ttctatacta gcgacatcgc cgtcgagtg 1320
 gagagcaacg gacagcccga gaacaactac aaaaccacac ctcccgtgct cgacagcgac 1380
 ggcagcttct tctgtactc caagctcacc gtggataagt ccaggtggca gcaaggcaac 1440
 gtgttttagct gcagcgtgat gcacgaagct ctccacaacc actataccca gaagtcacctc 1500
 agcctcagcc ctggcaagta gtga 1524

<210> 8
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 8

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

ES 2 675 568 T3

<210> 9
 <211> 486
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 9

10

```

gagaagaacc tctacctctc ctgcgtgctg aaggacgaca agcccacact ccagctggag      60
tccgtggacc ccaagaacta cccaagaag aagatggaga agcggttcgt gttcaacaag      120
atcgagatca acaacaagct ggagttcgag agcgcccagt tccccaactg gtacatttcc      180
acctcccagg ccgagaacat gcccgctttt ctgggdcgaa ccaagggcgg ccaggacatc      240
accgacttca ccatgcagtt cgtctccagc ggaggaagcg gaggcagcgg agctcccgtg      300
aggagcctga actgcacct gagggacagc cagcagaagt ccctggtgat gtccggacct      360
tacgaactga aggccctcca tctgcaagga caggatatgg agcagcaggt ggtgttctcc      420
atgtccttcg tccagggcga agagtccaac gacaagatcc ccgtggccct gggcctgaaa      480
tagtga                                          486
    
```

<210> 10
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 10

20

```

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

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

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

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

<210> 11
 <211> 1197
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 11

```

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

5

10

15

ES 2 675 568 T3

<210> 12
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 12

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

<210> 13
<211> 1623
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 13

tccaagaact tccacctgag gcctcgggac ctgatctcca acatcaacgt gatcgtgctg 60
gaactgaagg gctccgagac aaccttcatg tgcgagtacg cgcacgagac agctaccatc 120
gtggaatttc tgaaccggtg gatcaacctc tgccagtcca tcatctccac cctgaccggc 180
ggctcctcca gcaccaagaa aaccagctg cagctggaac atctgctgct ggacctgcag 240
atgatcctga acggcatcaa caactacaag aaccocaagc tgaccoggat gctgacctc 300
aagttctaca tgcccaagaa ggccaccgaa ctgaaacatc tgcagtgcct ggaagaagaa 360
ctgaagcccc tggaagaggt gctgaacctg gctcagggat ctggcggcgg atctgagctg 420
tgcgacgacg accctcctga gatccctcac gccacctca aggccatggc ttacaaagag 480
ggcaccatgc tgaactgcga gtgcaagaga ggcttcggc ggatcaagtc cggctcctg 540
tacatgctgt gcaccggcaa ctccagccac tcctcctggg acaaccagtg ccagtgcacc 600
tcctctgcca cccggaacac caccaaaca gtgaccccc agcccgagga acagaaagag 660
cgcaagacca ccgagatgca gtcccccatg cagcctgtgg accaggcttc tctgcctggc 720
cactgcagag agcctccacc ttgggagaac gaggctaccg agagaatcta ccacttcgtc 780
gtgggccaga tgggtacta ccagtgcgtg cagggtacc gcgcctgca tagaggacct 840
gctgagtcg tgtgcaagat gaccacggc aagaccoggt ggaccagcc tcagctgatc 900
tgtacaggcg gcggaggctc cgagcctaag tcctccgata agaccacac ctgtcccccc 960

ES 2 675 568 T3

tgtcctgccc ctgaaactgct gggaggccct tccgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag 1020
gacaccctga tgatctcccg gacccccgaa gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtcccac 1080
gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac gtggacggcg tgggaagtgca caacgcccaag 1140
accaagccca gagaggaaca gtacaactcc acctaccggg tgggtgtccgt gctgacctg 1200
ctgcaccagg attggctgaa tggcaaagag tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg 1260
ccagccccca tcgaaaagac catctccaag gccaaagggc agccccggga accccagggtg 1320
tacacactgc cccctagccg ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc 1380
gtgaaggget tctaccctc cgatatgcc gtggaatggg agtccaacgg ccagcctgag 1440
aacaattata agaccacccc ccctgtgctg gactccgacg gctcattctt cctgtacagc 1500
aagctgacag tggacaagtc ccggtggcag cagggcaacg tgttctcctg ctccgtgatg 1560
cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag aagtccctgt ccctgtctcc cggcaagtga 1620
tga 1623

5 <210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 14

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

15 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 15

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5

25 <210> 16
<211> 2
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
35 <400> 16

Gly Gly
1

ES 2 675 568 T3

<210> 17
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 17
 10
 Met Gly
 1

 <210> 18
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 20
 <400> 18

 Met Gly Gly
 1

 <210> 19
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 19
 30

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

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

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

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

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

 Cys Pro Gln Thr Phe Gln Glu Asn Asp Leu Ser Thr Phe Phe Pro Phe
 85 90 95

 Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Phe Phe Asp Thr Trp Asp Asn Glu Ala
 100 105 110

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

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

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

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

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150

<210> 21
 <211> 918
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

370		375		380															
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Thr	Leu				
385					390					395					400				
Thr	Val	Arg	Asn	Leu	Val	Gly	Lys	Ser	Asp	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Ile				
				405					410					415					
Pro	Ala	Cys	Asp	Phe	Gln	Ala	Thr	His	Pro	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Ala				
			420					425					430						
Phe	Pro	Lys	Asp	Asn	Met	Leu	Trp	Val	Glu	Trp	Thr	Thr	Pro	Arg	Glu				
		435					440					445							
Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Ile	Leu	Glu	Trp	Cys	Val	Leu	Ser	Asp	Lys	Ala				
	450					455						460							
Pro	Cys	Ile	Thr	Asp	Trp	Gln	Gln	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	His	Arg	Thr				
465					470					475					480				
Tyr	Leu	Arg	Gly	Asn	Leu	Ala	Glu	Ser	Lys	Cys	Tyr	Leu	Ile	Thr	Val				
				485					490					495					
Thr	Pro	Val	Tyr	Ala	Asp	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Glu	Ser	Ile	Lys	Ala				
			500					505					510						
Tyr	Leu	Lys	Gln	Ala	Pro	Pro	Ser	Lys	Gly	Pro	Thr	Val	Arg	Thr	Lys				
		515					520					525							
Lys	Val	Gly	Lys	Asn	Glu	Ala	Val	Leu	Glu	Trp	Asp	Gln	Leu	Pro	Val				
	530					535					540								
Asp	Val	Gln	Asn	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Arg	Thr				
545				550						555					560				
Ile	Ile	Gly	Asn	Glu	Thr	Ala	Val	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	His	Thr	Glu				
				565					570					575					
Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Met	Val	Arg	Met				
			580					585					590						
Ala	Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Gly	Gly	Lys	Asp	Gly	Pro	Glu	Phe	Thr	Phe				
		595					600					605							
Thr	Thr	Pro	Lys	Phe	Ala	Gln	Gly	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile	Val	Val	Pro				
	610					615					620								

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

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

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

Gly Gly Tyr Met Pro Gln
915

5 <210> 22
<211> 569
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Arg Glu Ala His Val Pro Leu Gly
 565

5 <210> 23
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

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

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

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

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

Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys
 65 70 75 80

ES 2 675 568 T3

Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24

<211> 142

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 24

5

10

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 25

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
 65 70 75 80
 Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
 85 90 95
 Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
 100 105 110
 His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
 115 120 125
 Asn Leu Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
 130 135 140
 Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu
 145 150 155 160
 Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
 165 170 175
 Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
 180 185 190
 Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
 195 200 205
 Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
 210 215 220
 Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
 225 230 235 240
 His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
 245 250 255
 Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly
 260 265 270
 Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr
 275 280 285
 His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 305 310 315 320

ES 2 675 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 26
- <211> 311
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 26

5

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

ES 2 675 568 T3

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
 20 25 30
 Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
 35 40 45
 Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Ser Ser
 50 55 60
 Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
 65 70 75 80
 Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
 85 90 95
 Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
 100 105 110
 His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
 115 120 125
 Asn Leu Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
 130 135 140
 Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu
 145 150 155 160
 Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
 165 170 175
 Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
 180 185 190
 Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
 195 200 205
 Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
 210 215 220
 Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
 225 230 235 240
 His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
 245 250 255
 Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly

ES 2 675 568 T3

260 265 270

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

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

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 305 310

5 <210> 27
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 568 T3

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro
 225 230 235 240
 Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr
 245 250 255
 Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly
 260 265 270
 Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala
 275 280 285
 His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Gly Gly Ser Glu
 290 295 300
 Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile
 305 310 315 320
 Val Gln Met Phe Ile Asn Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile
 325 330 335
 Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp
 340 345 350
 Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr
 355 360 365
 Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser
 370 375 380
 Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala
 385 390 395 400
 Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys

405

410

415

Glu Cys

- <210> 28
- <211> 194
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético
- <400> 28

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Cys

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de fusión que comprende los aminoácidos 1 a 303 de la SEQ ID NO: 26, o una secuencia de aminoácidos homóloga a la misma con al menos el 70 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos que comprende una IL-2 permutada circularmente y tiene una selectividad mejorada por IL-2R $\beta\gamma$ sobre IL-2R $\alpha\beta\gamma$ en relación con la IL-2 de tipo silvestre.
- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de fusión de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. Un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica el polipéptido de fusión de la reivindicación 1.
4. Un vector recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3.
- 15 5. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 4.
6. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1 para su uso en medicina.
- 20 7. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento del cáncer o de una afección autoinmune.

Complejo hexamérico de señalización de IL6

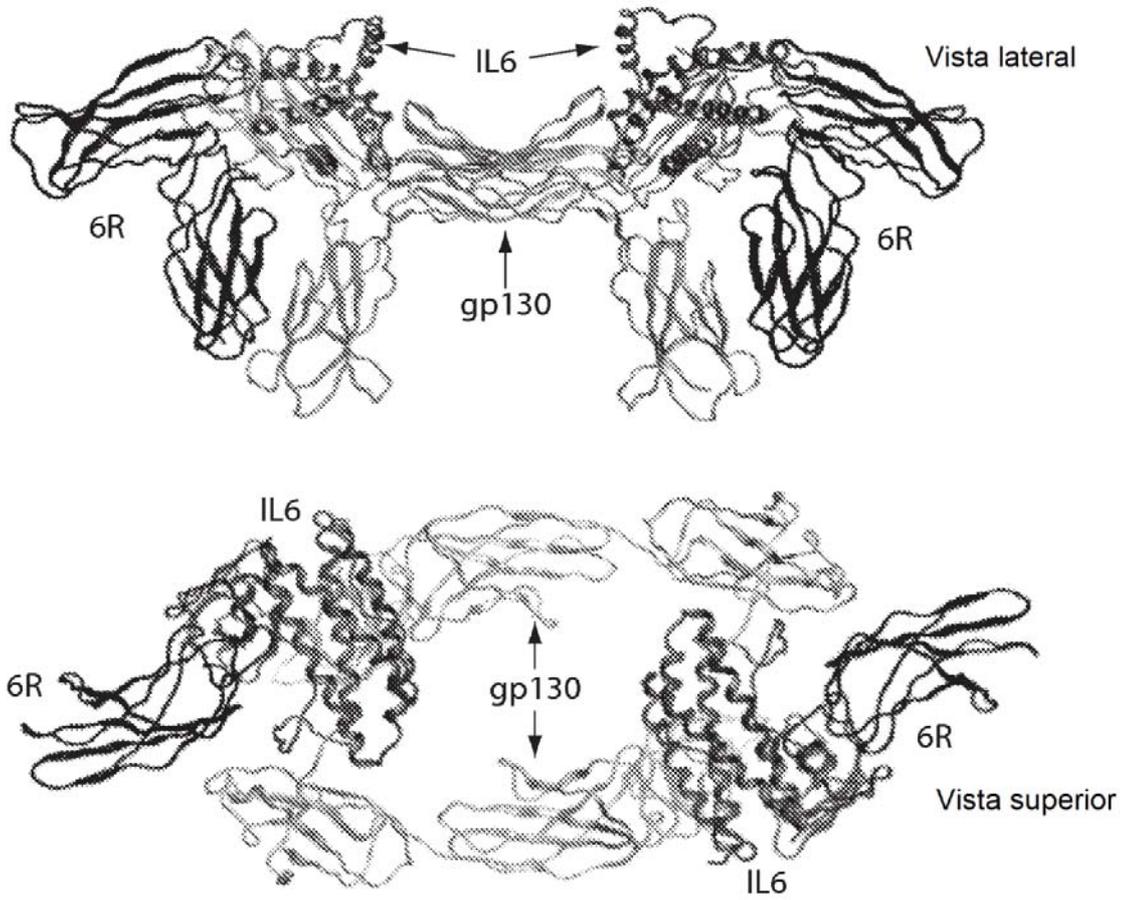


Fig. 1

Permutación circular de IL6

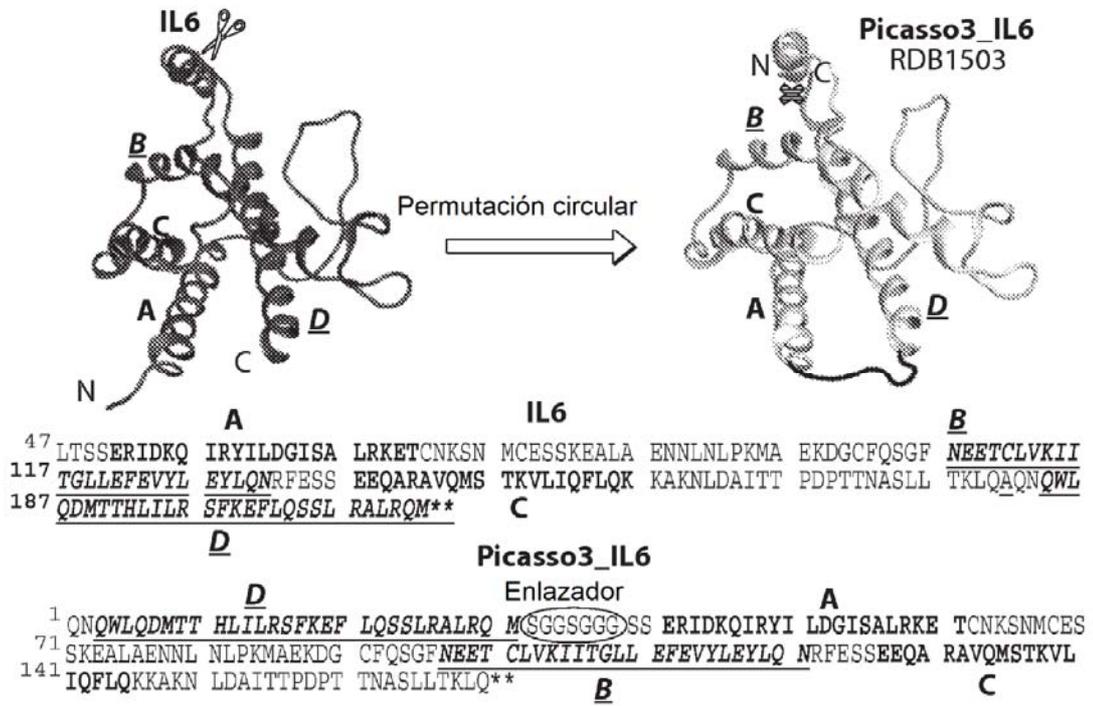


Fig. 2

RDB1527 (picasso3_D1) y RBD1529 (wtIL6_D1)

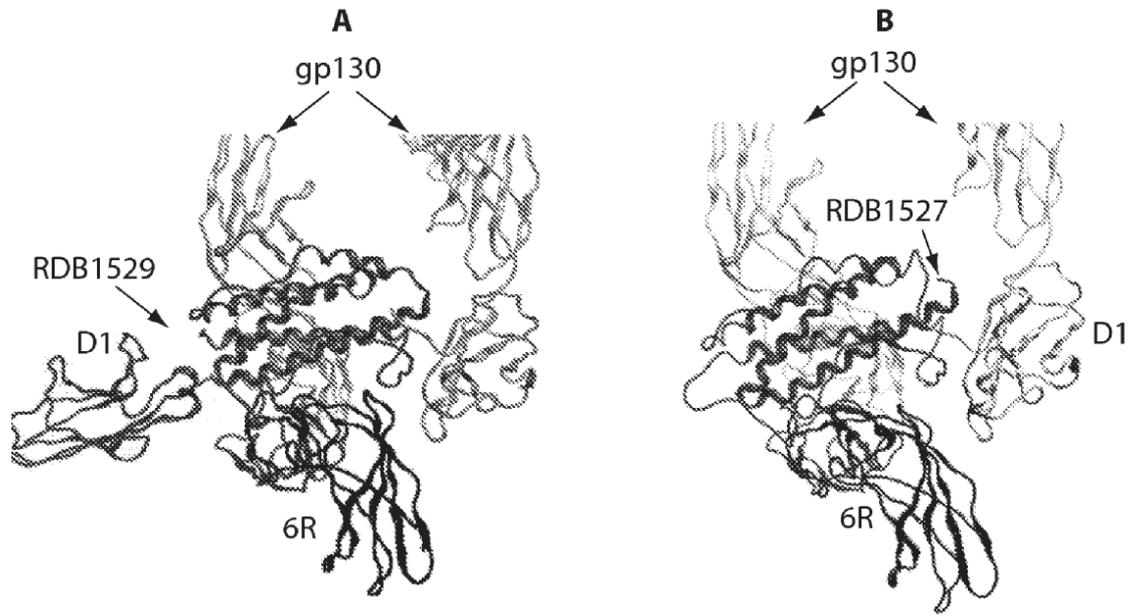


Fig. 3

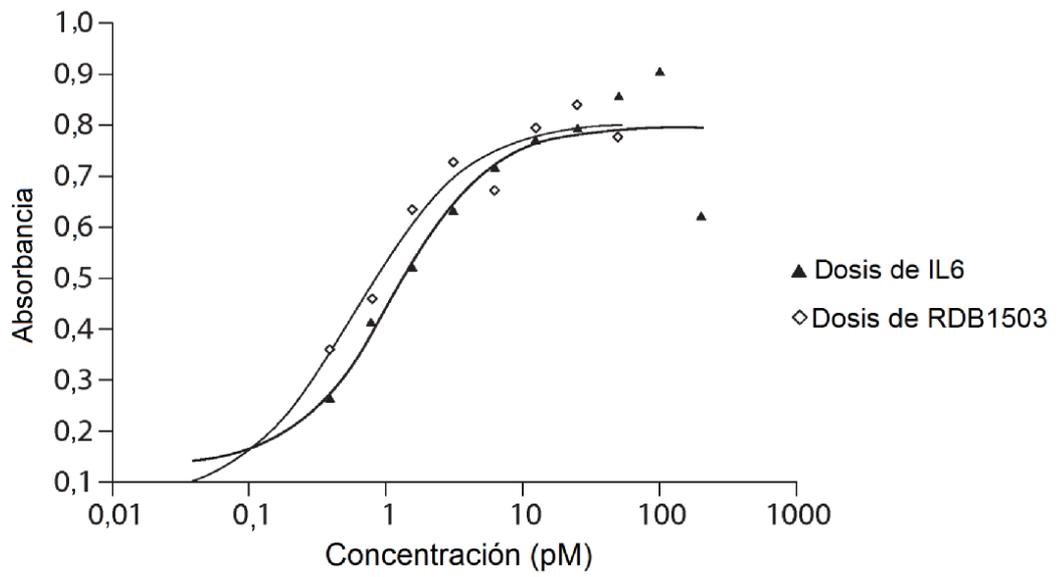


Fig. 4

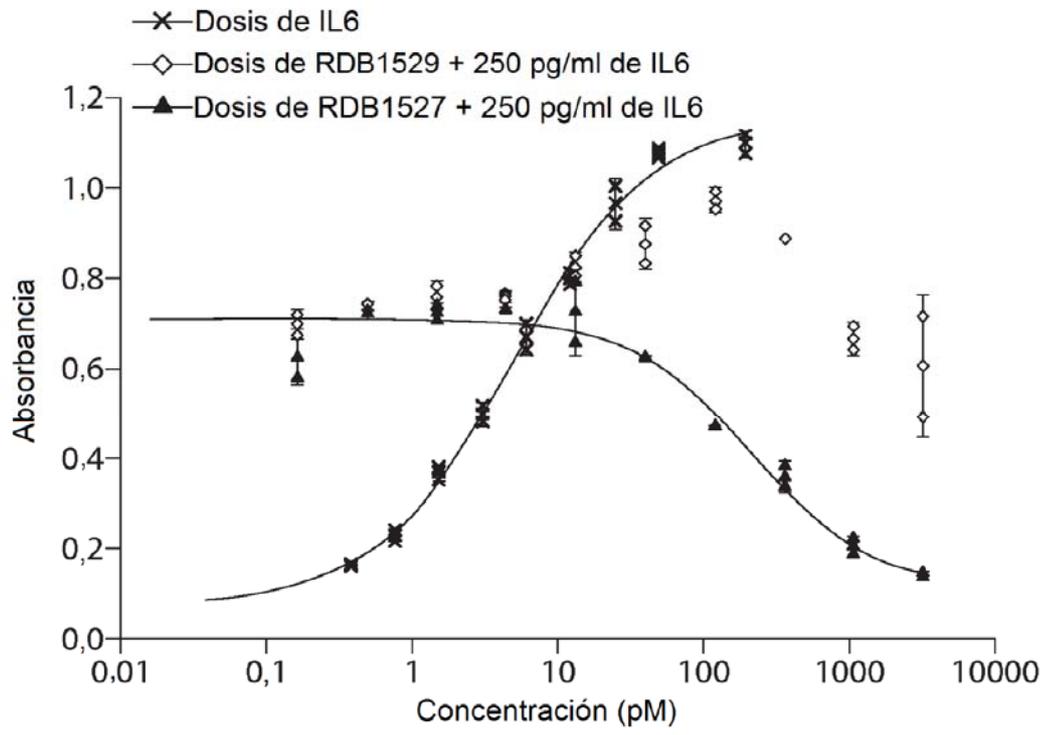


Fig. 5

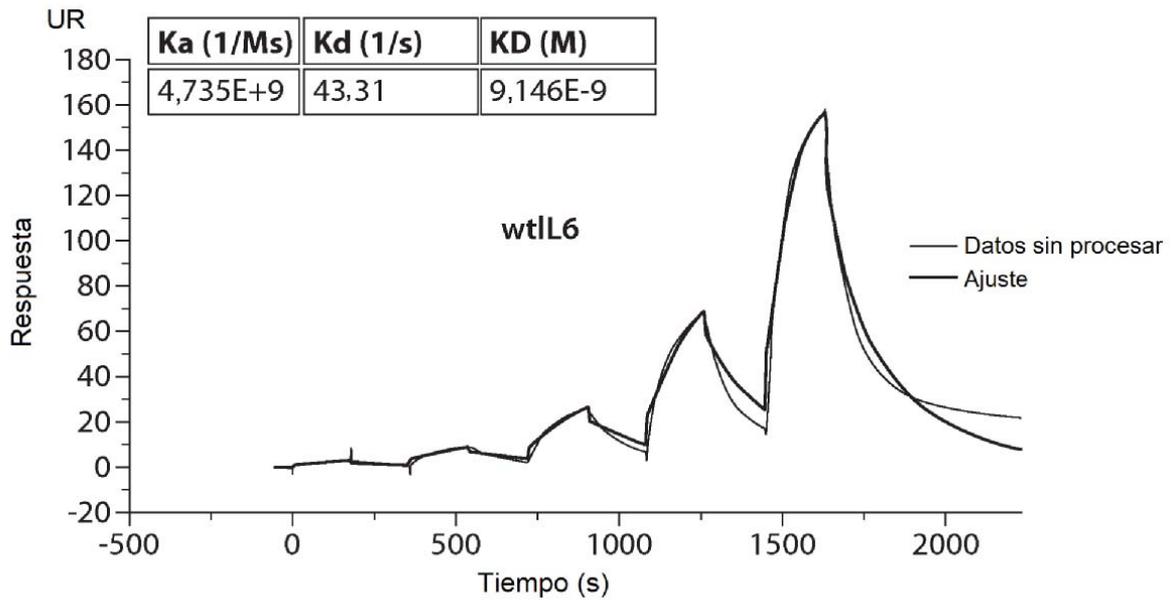


Fig. 6A

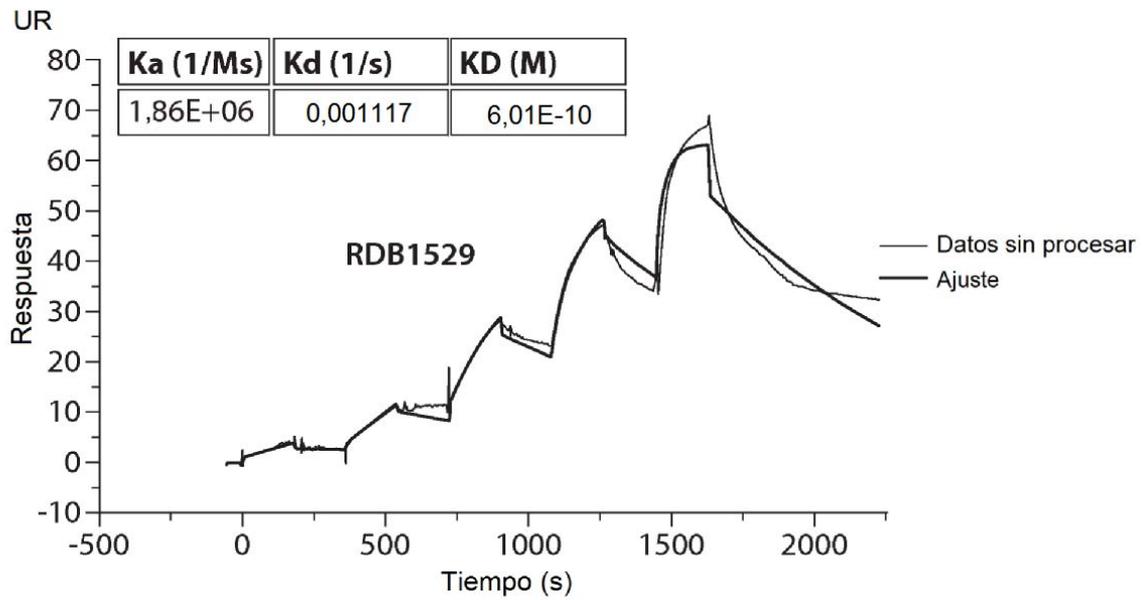


Fig. 6B

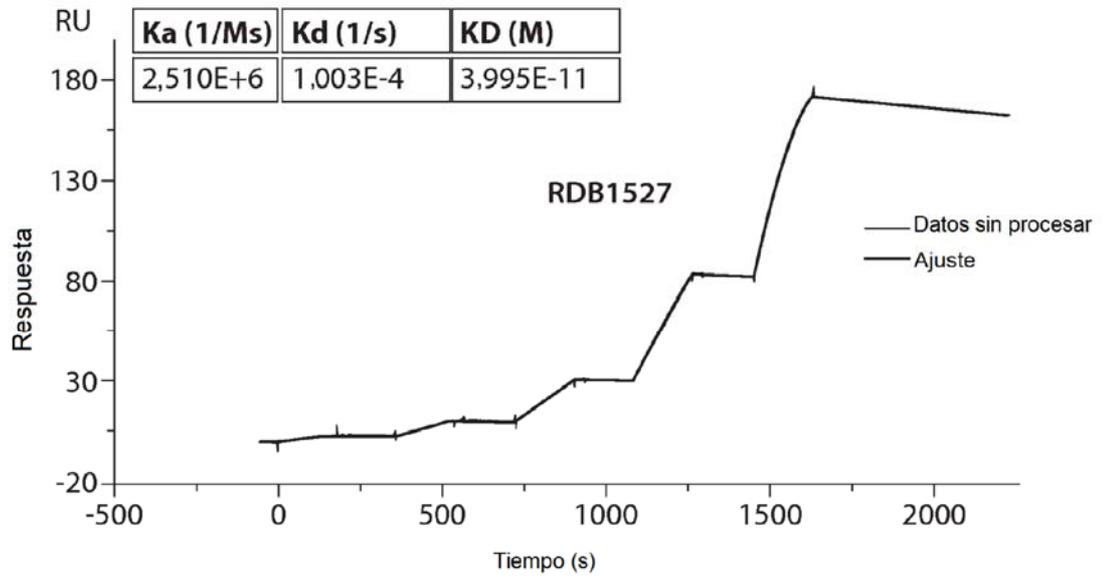


Fig. 6C

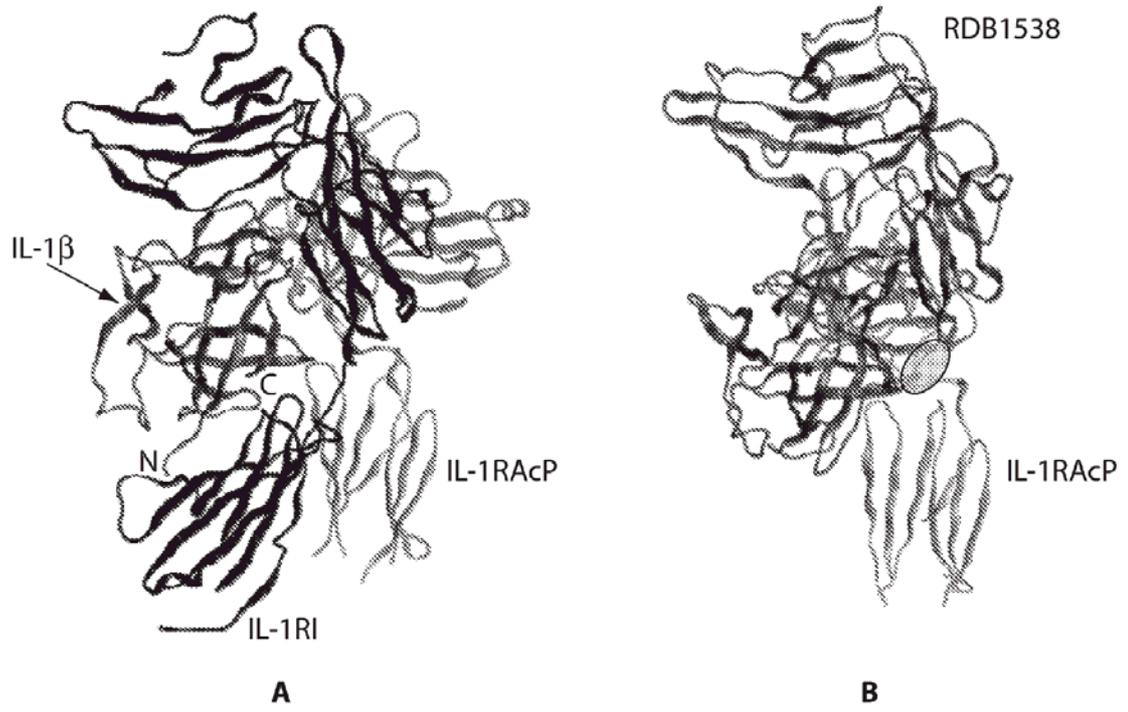


Fig. 7

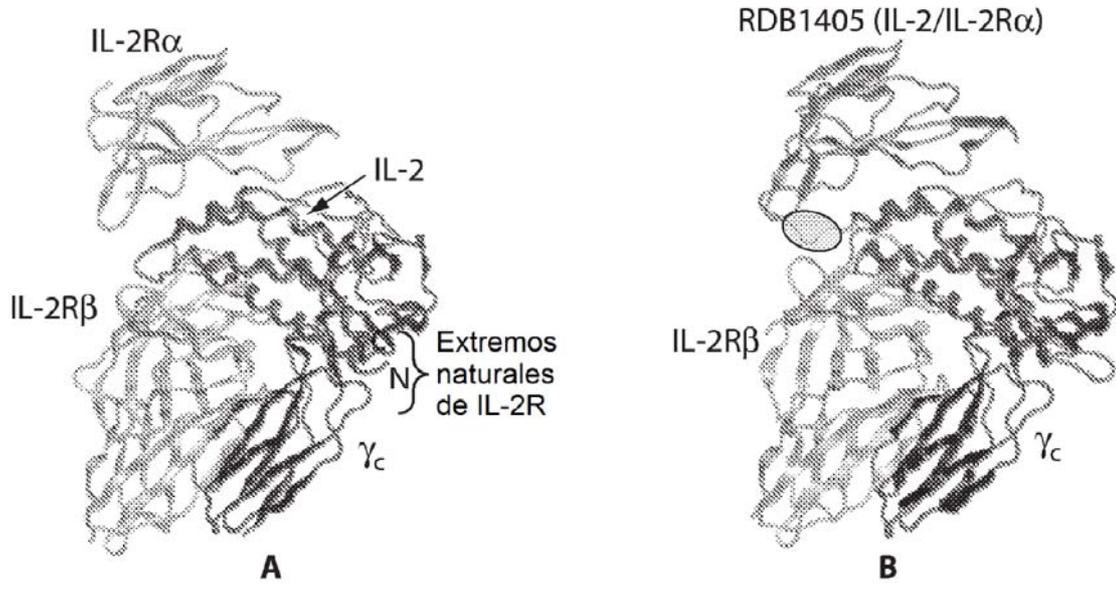


Fig. 8

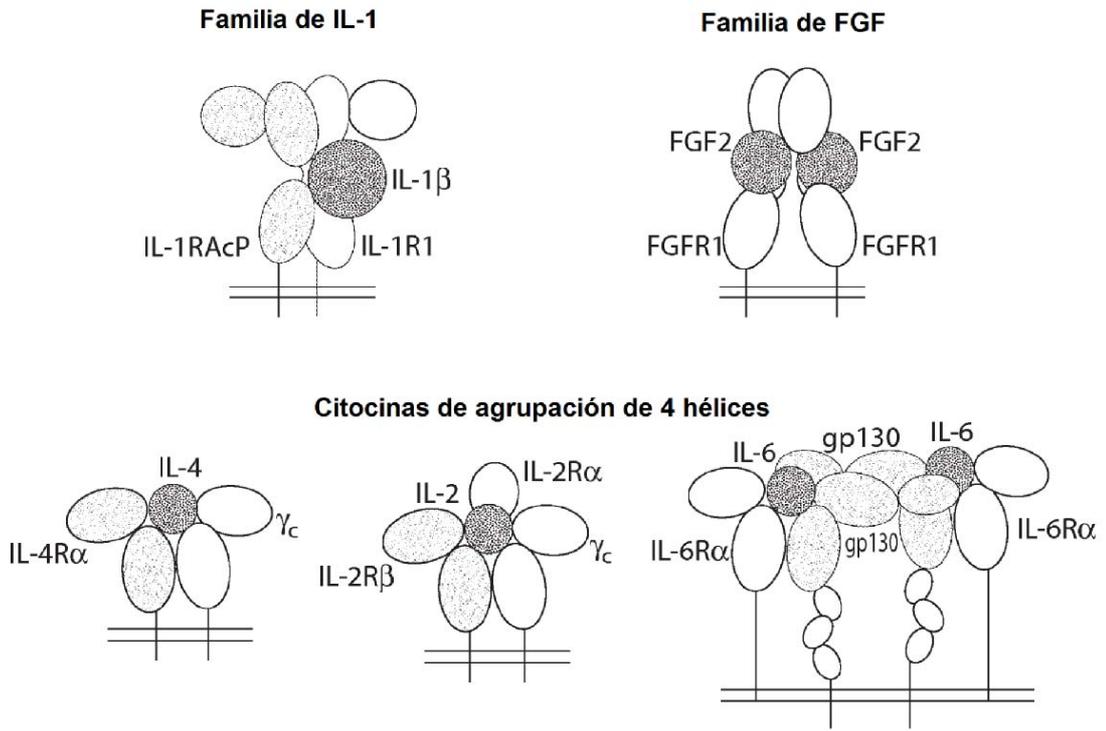


Fig. 9

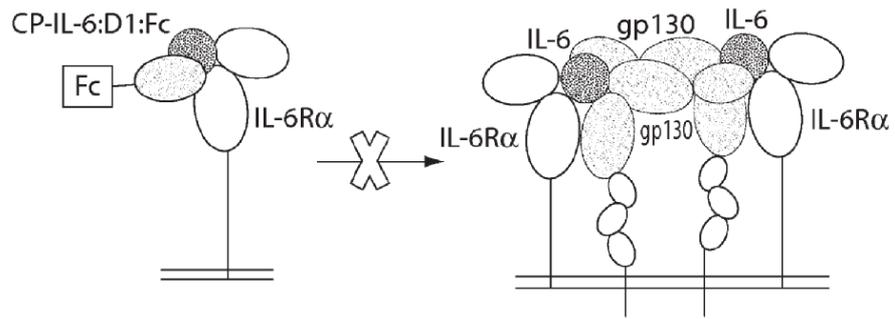
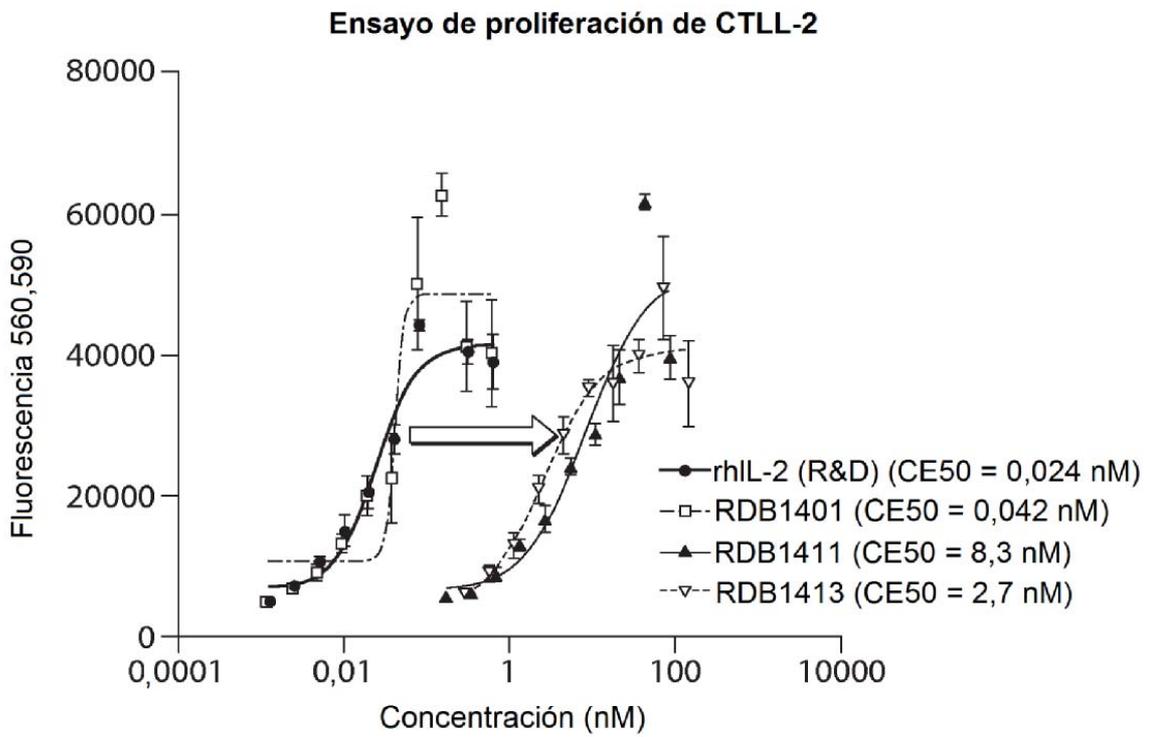
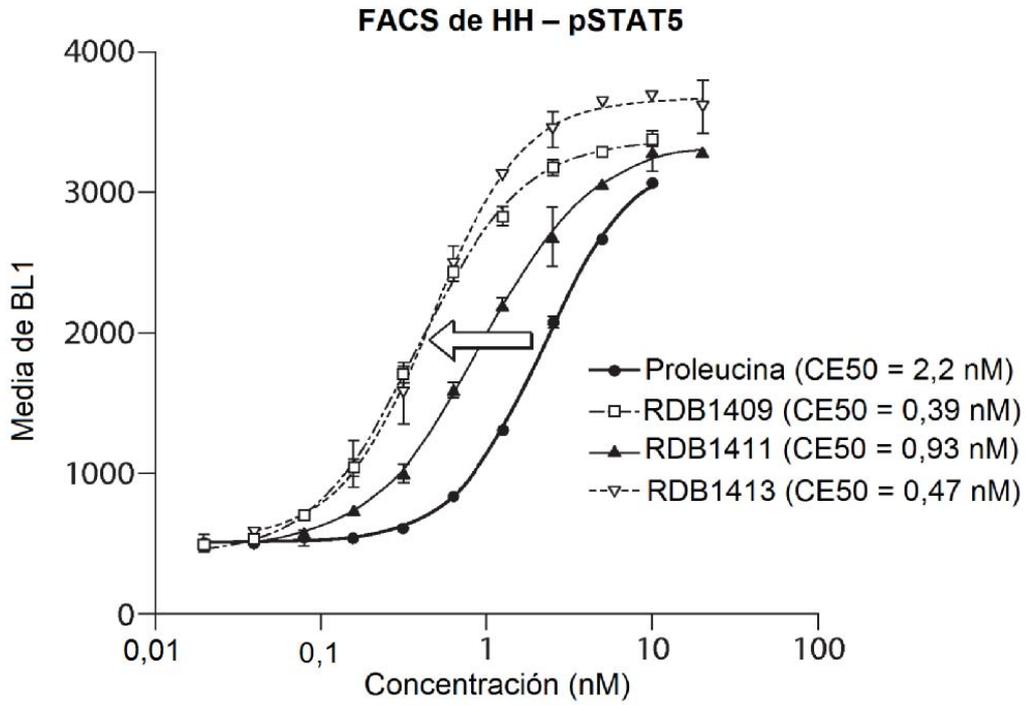


Fig. 10



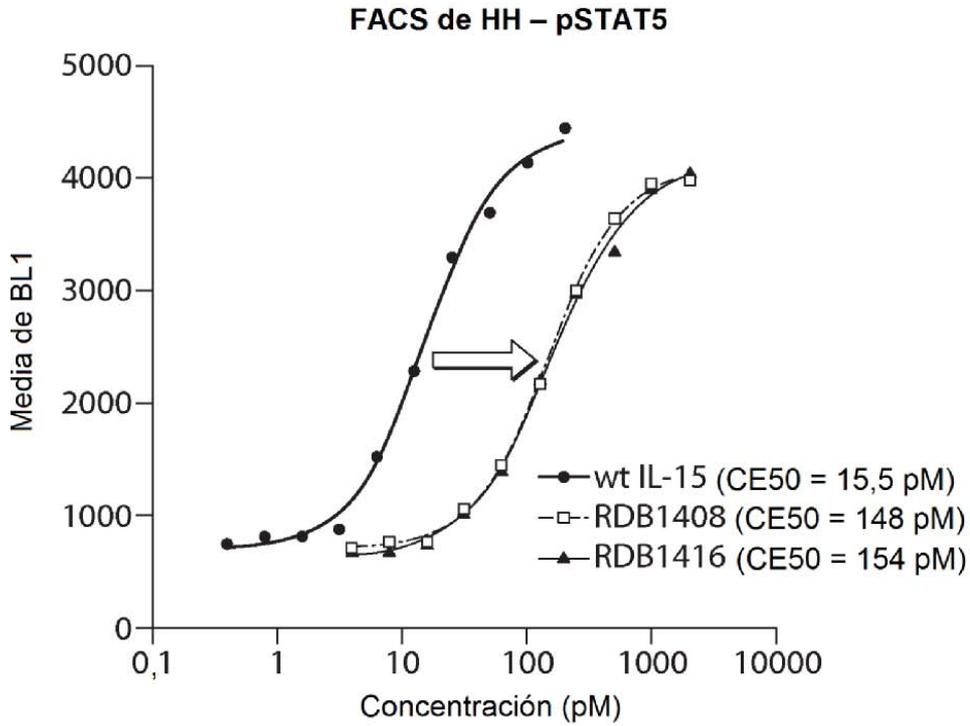


Fig. 12A

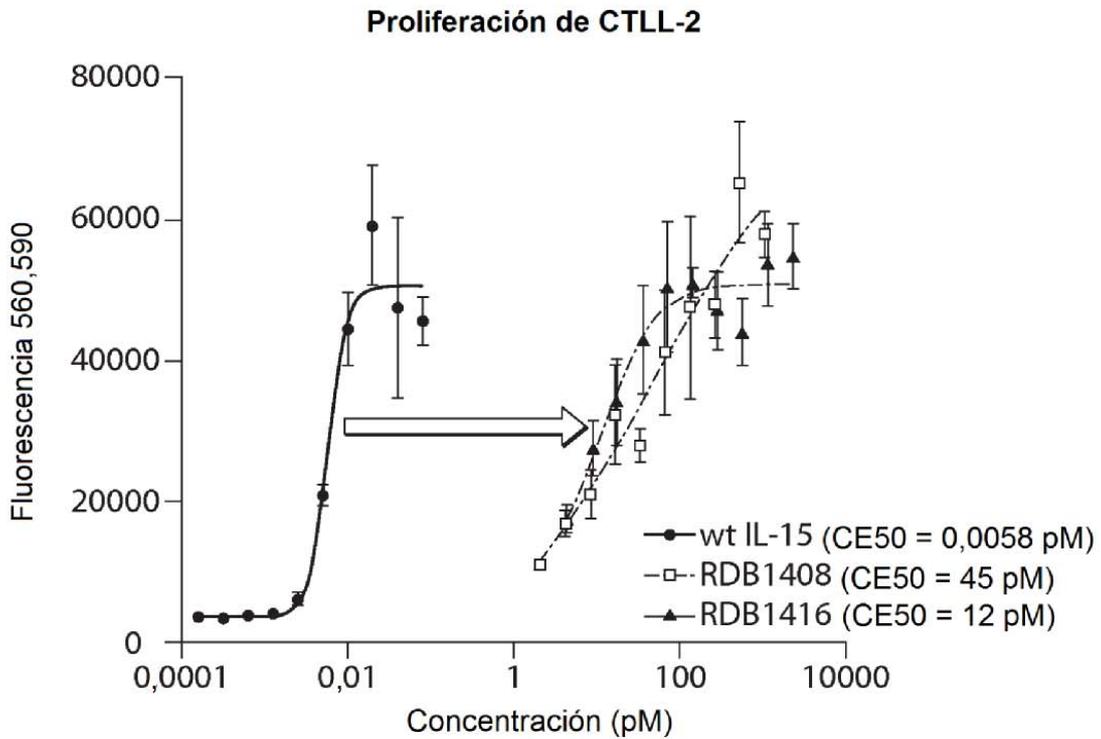


Fig. 12B

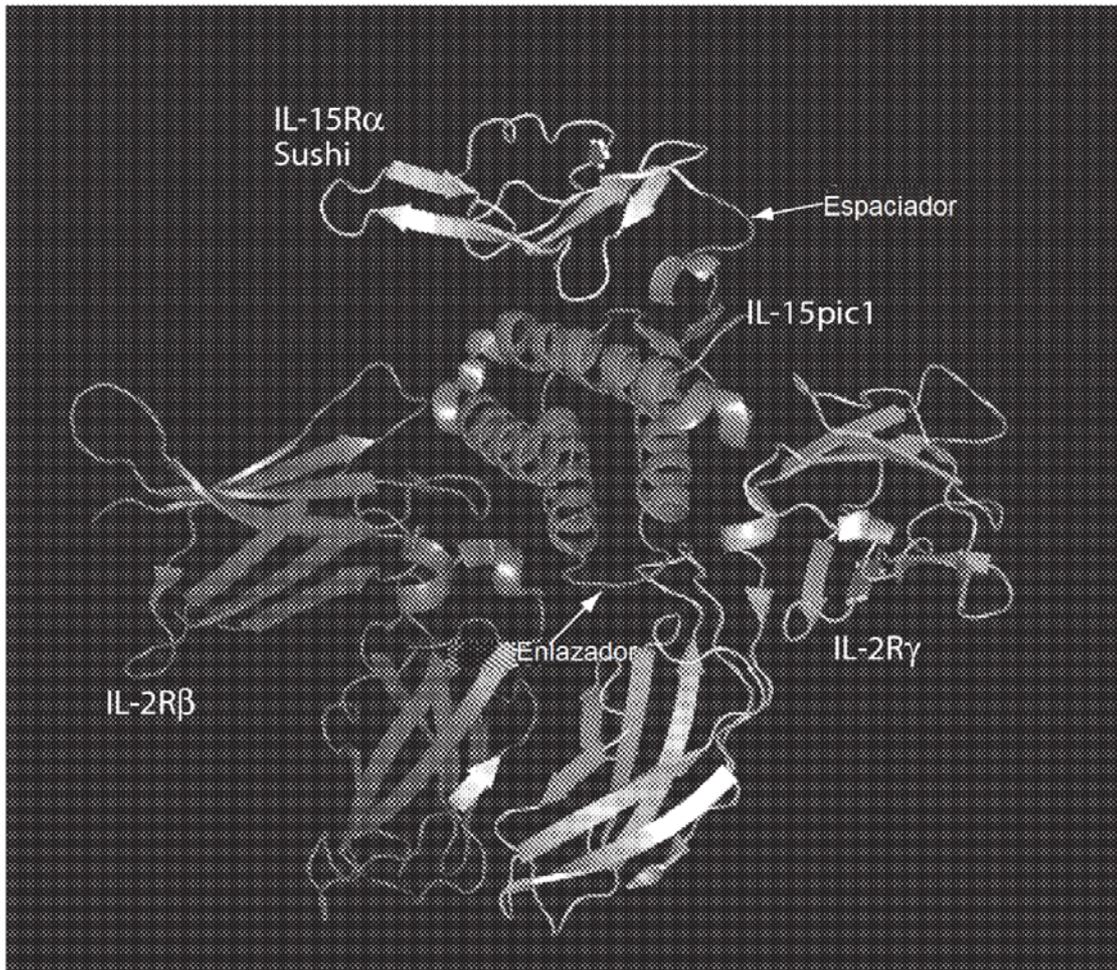


Fig. 13