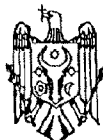




MD/EP 3628049 T2 2023.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3628049 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 14/71 (2006.01.01)
C07K 16/46 (2006.01.01)
A61K 38/17 (2006.01.01)
A61P 9/12 (2006.01.01)
A61P 9/10 (2006.01.01)
A61P 13/12 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0304 (22) Data de depozit: 2018.05.03 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18794202.4, 2018.05.03 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3628049, 2020.04.01 (31) Numărul cererii prioritare: 201762501229 P; 201762510422 P; 201762578674 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.05.04; 2017.05.24; 2017.10.30 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2023, 2023.10.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 19/2023, 2023.05.10 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2020, 2020.04.30
(71) Solicitant: ACCELERON PHARMA INC., US (72) Inventatori: KUMAR Ravindra, US; SAKO Dianne S., US (73) Titular: ACCELERON PHARMA INC., US (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Proteine de fuziune ale receptorului TGF-beta de tip II și utilizările acestora

(57) Rezumat:

1
Prezenta invenție se referă la o polipeptidă de fuziune a TβRII cuprinzând o porțiune heterologă și o porțiune trunchiată de legare a ligandului din domeniul extracelular al polipeptidei TβRII, utilă pentru antagonizarea selectivă a unui ligand TβRII. Invenția se

2
referă, de asemenea, la compoziții și metode pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor asociate TGFβ1.

Revendicări: 16

Figuri: 5

MD/EP 3628049 T2 2023.10.31

(54) TGF-beta receptor type ii fusion proteins and uses thereof**(57) Abstract:**

1
In certain aspects, the present disclosure relates to T β RII fusion polypeptides comprising a heterologous portion and a truncated, ligand-binding portion of the extracellular domain of T β RII polypeptide useful to selectively antagonize a T β RII

2
ligand. The disclosure further provides compositions and methods for use in treating or preventing TGF β associated disorders.

Claims: 16

Fig.: 5

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****STADIUL TEHNICII**

5

Membrii superfamiliei factorului de creștere și transformare beta (TGFβ) sunt citokine pleiotropice implicate în funcții celulare esențiale așa cum sunt proliferarea, diferențierea, apoptoza, motilitatea, producerea matricei extracelulare, remodelare tisulară, angiogeneză, răspuns imun, adeziune celulară, și joacă de asemenea un rol esențial în patofiziologia unor stări patologice diferite precum stările inflamatorii cronice și cancerul. Membrii superfamiliei TGFβ au fost clasificați în subgrupuri familiale majore, care includ TGFβ, proteine morfogenetice osoase (BMP), proteine osteogenice (OP), factori de creștere și diferențiere (GDF), inhibine/activine, substanțe inhibitoare mulleriene (MIS) și factori neurotrofici derivați din celulele gliale (GDNF).

10

Membrii superfamiliei TGFβ își transduc semnalele prin membrana plasmatică prin inducerea formării complexelor heteromerică de anumiți receptori serin/treonin kinază de tip I și tip II, care la rândul lor activează un anumit set de proteine SMAD (unele inhibitoare și altele excitatorii). Compușii cu moleculă SMAD transmit semnalele în nucleu unde acestea conduc răspunsuri transcripționale coordonat cu alte proteine.

15

Semnalizarea disfuncțională a superfamiliei TGFβ a fost asociată cu câteva afecțiuni clinice care includ cancer, fibroză, boli osoase, nefropatie diabetică, cât și boli vasculare cronice așa cum este ateroscleroza.

20

Astfel, un obiect al dezvăluirii prezente este furnizarea de compoziții și metode pentru modularea semnalizării prin superfamilia TGFβ.

25

REZUMAT

Invenția este definită de revendicări. Într-un prim aspect, invenția prezentă se referă la o polipeptidă de fuziune a Receptorului II pentru factorul de creștere și transformare β (TβRII) care cuprinde: a) un domeniu extracelular al unei părți TβRII care cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90%, 95%, 97%, 99% sau 100% cu SEQ ID NO: 18; b) o parte heteroloagă, unde partea heteroloagă este un domeniu Fc de imunoglobulină, și c) o parte linker care cuprinde (GGGS)_n, unde n = 4, 5 sau 6; unde domeniul extracelular al părții TβRII este conectat la partea heteroloagă prin intermediul părții linker; și unde polipeptida de fuziune leagă factorul de creștere și transformare β1 (TGFβ1) și factorul de creștere și transformare β3 (TGFβ3).

30

În conformitate cu o formă de realizare preferată a primului aspect al invenției, partea domeniu extracelular de TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90%, 95% sau 97% cu SEQ ID NO: 18.

35

În conformitate cu o altă formă de realizare preferată a primului aspect al invenției, partea domeniu extracelular de TβRII cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18. În conformitate cu o formă de realizare suplimentară preferată a primului aspect al invenției, polipeptida cuprinde o secvență lider N-terminală. În conformitate cu o formă de realizare preferată în special a primului aspect al invenției, secvența lider N-terminală cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 23.

40

În conformitate cu o formă de realizare suplimentară preferată a primului aspect al invenției, partea heteroloagă cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90%, 95% sau 97% cu SEQ ID NO: 20. În conformitate cu o altă formă de realizare preferată a primului aspect al invenției, partea heteroloagă cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20. În conformitate cu încă o altă formă de realizare preferată, linkerul cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 6. În conformitate cu o formă de realizare suplimentară preferată a primului aspect al invenției, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% sau 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 13, 53 sau 56. În încă o altă formă de realizare preferată a primului aspect al invenției, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 13, 53 sau 56. Într-o formă de realizare suplimentară preferată a primului aspect al invenției, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90%, 95%, 97% sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 48. Într-o altă formă de realizare preferată a primului aspect al invenției, polipeptida cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 48. În încă o formă de realizare suplimentară preferată a primului aspect al invenției, polipeptida leagă TGFβ1 cu o K_D mai mică de 200 pM, mai mică de 150 pM, mai mică de 100 pM, mai mică de 75 pM, mai mică de 50 pM sau mai mică de 25 pM și/sau polipeptida leagă TGFβ3 cu o K_D mai mică de 75

45

50

55

pM, mai mică de 70 pM, mai mică de 60 pM, mai mică de 50 pM, mai mică de 40 pM, mai mică de 35 pM, mai mică de 25 pM, mai mică de 15, mai mică de 10 sau mai mică de 5 pM.

Într-o altă formă de realizare preferată a primului aspect al invenției, polipeptida inhibă TGFβ1 cu o IC₅₀ mai mică de 0,1 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter și/sau polipeptida inhibă TGFβ3 cu o IC₅₀ mai mică de 0,05 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. Într-o formă de realizare preferată în special a primului aspect al invenției, analiza cu genă reporter este o analiză cu reporter CAGA.

Într-un al doilea aspect, invenția prezintă se referă la un preparat farmaceutic care cuprinde o polipeptidă în conformitate cu primul aspect al invenției prezente și un excipient acceptabil farmaceutic.

Parțial, dezvoltarea de față se referă la proteine de fuziune cu polipeptida TβRII și la utilizarea unor astfel de proteine de fuziune ca antagoniști selectivi pentru TGFβ1 sau TGFβ3. Așa cum este descris aici, polipeptidele care cuprind parțial sau în întregime domeniul extracelular (ECD) al TβRII, cu sau fără mutații suplimentare, leagă și/sau inhibă TGFβ1 sau TGFβ3 cu afinități diferite. În particular, polipeptidele TβRII care cuprind o parte heteroloagă (de exemplu, un domeniu Fc de imunoglobulină) și un linker cu o lungime de cel puțin 10 aminoacizi (de exemplu, un linker care are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 6) sunt asociate cu proprietăți de legare la TGFβ1 și TGFβ3 surprinzător de superioare, comparativ cu polipeptidele TβRII care au un linker mai scurt. Astfel, în unele cazuri, dezvoltarea furnizează polipeptide TβRII pentru utilizarea în inhibarea selectivă a afecțiunilor asociate superfamiliei TGFβ.

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune a receptorului II pentru factorului de creștere și transformare-β (TβRII) care cuprinde: a) un domeniu extracelular al unei părți TβRII; b) o parte heteroloagă, și c) o parte linker; unde linkerul are o lungime de cel puțin 10 aminoacizi; și unde partea de domeniu extracelular a TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% cu: i) o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1 sau ii) o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 90% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 95% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 90% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 95% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 97% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% cu SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 90% cu SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 95% cu SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi identică cel puțin 97% cu SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, partea domeniu extracelular al TβRII cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18. În unele

cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 90% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 95% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 97% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 35 din SEQ ID NO: 1 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 153 la 159 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 90% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 95% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 97% cu o secvență care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi care începe în oricare dintre pozițiile de la 23 la 60 din SEQ ID NO: 2 și care se termină la oricare dintre pozițiile de la 178 la 184 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% cu SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 90% cu SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 95% cu SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, partea domeniu extracelular al T β R α II constă într-o secvență de aminoacizi identică cel puțin 97% cu SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, partea domeniu extracelular al T β R α II constă în secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență lider N-terminală. În unele cazuri, secvența lider N-terminală cuprinde secvența de aminoacizi din oricare din SEQ ID NO: 22-24. În unele forme de realizare, secvența lider N-terminală cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 23. În unele forme de realizare, partea heteroloagă este un domeniu Fc de imunoglobulină. În unele cazuri, domeniul Fc de imunoglobulină este un domeniu Fc de imunoglobulină umană. În unele cazuri, partea heteroloagă cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80% cu SEQ ID NO: 20. În unele forme de realizare, partea heteroloagă cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% cu SEQ ID NO: 20. În unele cazuri, linkerul are o lungime mai mică de 25 de aminoacizi. În unele cazuri, linkerul are o lungime între 10 și 25 de aminoacizi. În unele cazuri, linkerul are o lungime între 15 și 25 de aminoacizi. În unele cazuri, linkerul are o lungime între 17 și 22 de aminoacizi. În unele cazuri, linkerul are o lungime de 21 de aminoacizi. În unele cazuri, partea heteroloagă cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 95% cu SEQ ID NO: 20. În unele forme de realizare, partea heteroloagă cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 97% cu SEQ ID NO: 20. În unele forme de realizare, partea heteroloagă cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20. În unele cazuri, linkerul cuprinde (GGGGS) $_n$, unde $n \geq 2$. În unele cazuri, linkerul cuprinde (GGGGS) $_n$, unde $n \geq 3$. În unele cazuri, linkerul cuprinde (GGGGS) $_n$, unde $n \geq 4$. În unele cazuri, linkerul cuprinde (GGGGS) $_n$, unde $n \neq 5$. În unele cazuri, linkerul cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 21. În unele cazuri, linkerul cuprinde secvența de aminoacizi din oricare din SEQ ID NO: 4-7. În unele forme de realizare, linkerul cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 6. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 11. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 11. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 11. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 13. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% cu secvența de aminoacizi

din SEQ ID NO: 13. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 13. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 13. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 50. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 50. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 50. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 51. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 51. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 51. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 53. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 53. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 53. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 56. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 56. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 56. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 15. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 15. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 15. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 15. În unele cazuri, polipeptida T β R α II nu include aminoacizii 185-592 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, polipeptida T β R α II nu include aminoacizii 1-22 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, polipeptida constă din sau constă esențial din: a) o parte de polipeptidă T β R α II care cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97%, sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18 și nu mai mult de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari; b) o parte linker care cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97%, sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 6 și nu mai mult de 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari; c) o parte heteroloagă care cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97%, sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20 și nu mai mult de 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, sau 1 aminoacizi suplimentari; și d) opțional o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23). În unele cazuri, polipeptida constă din sau constă esențial din: a) o parte de polipeptidă T β R α II care cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 18 și nu mai mult de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari; b) o parte linker care cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 6 și nu mai mult de 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari; c) o parte heteroloagă care cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 20 și nu mai mult de 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, sau 1 aminoacizi suplimentari; și d) opțional o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23). În unele cazuri, polipeptida cuprinde: a) un domeniu extracelular al unei părți a T β R α II; unde domeniul extracelular cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97%, sau 99% cu secvența din SEQ ID NO: 18; b) o parte heteroloagă, unde partea heteroloagă cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu secvența din SEQ ID NO: 20; și c) o parte linker care conectează domeniul extracelular și partea heteroloagă; unde linkerul cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97%, sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 6. În unele cazuri, polipeptida cuprinde: a) un domeniu extracelular al unei părți a T β R α II; unde domeniul extracelular cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 18; b) o parte heteroloagă, unde partea heteroloagă cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 20; și c) o parte linker care conectează domeniul extracelular și partea heteroloagă; unde linkerul cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 6. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97%, sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 48. În unele forme de realizare, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 48. În unele cazuri, polipeptida nu include o secvență lider, sau în care secvența lider a fost îndepărtată. În unele cazuri, polipeptida include unul sau mai multe resturi de aminoacizi modificate selectate dintre: un aminoacid glicozilat, un aminoacid PEGilat, un aminoacid farnesilat, un aminoacid

acetilat, un aminoacid biotinitat, un aminoacid conjugat la o fracțiune lipidică și un aminoacid conjugat la un agent de derivatizare organică. În unele cazuri, polipeptida este glicozilată. În unele cazuri, polipeptida are un model de glicozilare caracteristic pentru exprimarea polipeptidei în celule CHO. În unele forme de realizare, polipeptida leagă TGFβ1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (KD) mai mică de 100 pM. În unele cazuri, polipeptida leagă TGFβ1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (KD) mai mică de 75 pM. În unele cazuri, polipeptida leagă TGFβ3 uman cu o constantă de disociere la echilibru (KD) mai mică de 60 pM. În unele cazuri, polipeptida leagă TGFβ3 uman cu o constantă de disociere la echilibru (KD) mai mică de 50 pM. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ1 cu o IC50 mai mică de 1,0 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ1 cu o IC50 mai mică de 0,25 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ1 cu o IC50 mai mică de 0,1 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ1 cu o IC50 mai mică de 0,05 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ3 cu o IC50 mai mică de 0,3 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ3 cu o IC50 mai mică de 0,1 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ3 cu o IC50 mai mică de 0,05 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ3 cu o IC50 mai mică de 0,04 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele forme de realizare, analiza cu genă reporter este o analiză cu reporter CAGA.

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează un homodimer care cuprinde oricare două dintre polipeptidele dezvoltate aici.

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează un polinucleotid izolat care cuprinde o secvență codificantă pentru oricare dintre polipeptidele dezvoltate aici. În unele cazuri, dezvoltarea furnizează un polinucleotid recombinant care cuprinde o secvență promotor legată operabil la oricare dintre polinucleotidele dezvoltate aici. În unele cazuri, polinucleotidul cuprinde o secvență de nucleotide care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 97% sau 100% cu oricare dintre SEQ ID NO: 10, 12 sau 14.

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o celulă transformată cu oricare dintre polinucleotidele dezvoltate aici. În unele cazuri, celula este o celulă mamiferă. În unele cazuri, celula este o celulă CHO sau o celulă umană.

În unele forme de realizare, dezvoltarea furnizează un preparat farmaceutic care cuprinde un excipient acceptabil farmaceutic și polipeptida conform invenției.

Aici este descrisă de asemenea o metodă de modulare a răspunsului unei celule la un membru al superfamiliei TGFβ, metoda cuprinzând expunerea celulei la oricare dintre polipeptidele dezvoltate aici sau la oricare dintre homodimerii dezvoltati aici. În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o metodă de tratament al unei boli sau stări asociate cu un membru al superfamiliei TGFβ într-un pacient care are nevoie de aceasta, metoda cuprinzând administrarea către pacient a unei cantități eficiente din oricare dintre polipeptidele dezvoltate aici sau din oricare dintre homodimerii dezvoltati aici. În unele cazuri, membrul superfamiliei TGFβ este TGFβ1 sau TGFβ3. În unele cazuri, boala sau starea este un cancer. În unele cazuri, cancerul este selectat dintre cancer gastric, cancer intestinal, cancer de piele, cancer mamar, melanom, cancer osos și cancer de tiroidă. În unele cazuri, boala sau starea este o boală sau stare fibrotică sau sclerotică. În unele cazuri, boala sau starea fibrotică sau sclerotică este selectată dintre sclerodermie, lupus eritematos, fibroză pulmonară, ateroscleroză, fibroză hepatică, scleroză sistemică difuză, glomerulonefrită, glioză, cicatrizare dermică, fibroză indusă de radiații, fibroză hepatică, fibroză pulmonară idiopatică și mielofibroză. În unele cazuri, boala sau starea este mielofibroză. În unele cazuri, boala sau starea este selectată din grupul care constă în mielofibroză primară, mielofibroză post-policitemia vera și mielofibroză post-trombocitemie esențială. În unele cazuri, boala sau starea este selectată din grupul care constă în mielofibroză cu risc mic, cu risc intermediar-1, cu risc intermediar-2 sau cu risc înalt, conform sistemului internațional de scor pentru prognostic (IPSS) sau IPSS dinamic (DIPSS). În unele cazuri, boala sau starea este boală cardiacă. În unele cazuri, boala sau starea este selectată dintre telangiectazie hemoragică ereditară (HHT), sindrom Marfan, sindrom Loeys-Dietz, sindromul anevrismului aortei toracice familial, sindrom de tortuozitate arterială, pre-eclampsie, ateroscleroză, restenozare și cardiomiopatie hipertrofică/insuficiență cardiacă congestivă. În unele cazuri, boala sau starea este hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, hipertensiunea pulmonară este hipertensiune pulmonară de Clasa I, Clasa II, Clasa III sau Clasa IV așa cum este recunoscut de Organizația Mondială a Sănătății. În unele cazuri, boala sau starea este o boală sau stare asociată renal. În unele cazuri, boala sau starea asociată renal este selectată din grupul care constă în: boli (sau insuficiențe) renale cronice, boli (sau insuficiențe) renale acute, boli renale primare, boli renale nediabetice, glomerulonefrită, nefrită interstițială, boli renale diabetice, nefropatie diabetică, glomeruloscleroză, glomerulonefrită cu evoluție rapidă, fibroză renală, sindrom Alport, Nefrită IDDM, glomerulonefrită

proliferativă mesangială, glomerulonefrită membrano-proliferativă, glomerulonefrită crescentică, fibroză interstițială renală, glomeruloscleroză focală segmentară, nefropatie membranoasă, boală cu schimbări minime, glomerulonefrită pauci-imună cu evoluție rapidă, nefropatie cu IgA, boala rinichiului polichistic, boala Dent, nefrocalcinoză, nefrită Heymann, boala rinichiului polichistic autozomal dominantă (a adultului), boala rinichiului polichistic autozomal recesivă (a copilăriei), leziuni renale acute, sindrom nefrotic, ischemie renală, boli sau afecțiuni ale podocitelor, proteinurie, boli glomerulare, glomerulonefrită membranoasă, glomerulonefrită focală segmentară, pre-eclampsie, eclampsie, leziuni renale, boli de collagen vasculare, proteinurie benignă ortostatică (posturală), nefropatie cu IgM, nefropatie membranoasă, sarcoidoză, diabet zaharat, afectarea medicamentoasă a rinichilor, boala Fabry, aminoaciduria, sindrom Fanconi, nefroscleroză hipertensivă, nefrită interstițială, anemia cu celule falciforme, hemoglobinuria, mioglobinuria, granulomatoza Wegener, boala depozitării glicogenului de tip I, boala renală cronică, insuficiența renală cronică, rată de filtrare glomerulară (GFR) joasă, nefroangioscleroză, nefrită lupică, glomerulonefrită pauci-imună crescentică pozitivă pentru ANCA, nefropatie cronică a alogrefei, nefrotoxicitate, toxicitate renală, necroză renală, lezare renală, lezare glomerulară și tubulară, disfuncție renală, sindrom nefritic, insuficiență renală acută, insuficiența renală cronică, disfuncția tubilor proximali, respingere acută de transplant renal, respingere cronică de transplant renal, glomerulonefrită proliferativă mesangial fără IgA, glomerulonefrită postinfecțioasă, vasculite cu implicare renală de orice tip, orice boală renală hereditară, orice nefrită interstițială, rejecția transplantului renal, cancer renal, boală renală asociată altor stări (de exemplu, hipertensiune, diabet și boală autoimună), boala Dent, nefrocalcinoză, nefrită Heymann, o boală renală primară, o glomerulopatie cu colaps, o boală cu depozite dense, o glomerulonefrită asociată crioglobulinemiei, o boală Henoch-Schonlein, o glomerulonefrită postinfecțioasă, o endocardită bacteriană, o poliangeită microscopică, un sindrom Churg-Strauss, o glomerulonefrită mediată de anticorpi anti-GBM, amiloidoză, o boală de depozitare a imunoglobulinelor monoclonale, o glomerulonefrită fibrilară, o glomerulopatie imunotactoidă, lezare tubulară ischemică, o tubulo-nefrită interstițială indusă de medicamente, o tubulo-nefrită interstițială toxică, o tubulo-nefrită interstițială infecțioasă, o pielonefrită bacteriană, o tubulonefrită interstițială infecțioasă viral care rezultă dintr-o infecție cu poliomavirus sau o infecție cu HIV, o boală tubulo-interstițială indusă metabolic, o boală mixtă de țesut conjunctiv, o nefropatie mielomatoasă, o nefropatie cu cristale care poate rezulta din depozitarea de urați sau oxalați sau de cristale induse de medicamente, o respingerea alogrefei tubulo-interstițiale celulare, o boală infiltrativă tumoral care rezultă dintr-un limfom sau o boală limfoproliferativă post-transplant, o boală renală obstructivă, boală vasculară, o microangiopatie trombotică, o nefroangioscleroză, o boală ateroembolică, o boală mixtă de țesut conjunctiv, o poliarterită nodoasă, o boală vasculară indusă de inhibitori de calcineurină, o respingere de alogrefă celulară vasculară acută, o respingere de alogrefă umorală acută, scădere precoce a funcției renale (ERFD), boală renală în stadiu terminal (ESRD), tromboza venelor renale, necroză tubulară acută, nefrită interstițială acută, boală renală cronică stabilită, stenoza arterei renale, nefropatie ischemică, uremie, tubulonefrită interstițială cronică indusă de medicamente și toxine, nefropatie de reflux, litiază renală, sindrom Goodpasture, anemie normocromă normocitară, anemie renală, boală renală cronică diabetică, boală asociată cu IgG4, sindrom von Hippel-Lindau, scleroză tuberoasă, nefronoftizie, boală renală chistică medulară, carcinom al celulelor renale, adenocarcinom, nefroblastom, limfom, leucemie, afecțiune de hiposialilare, nefropatie cronică cauzată de ciclosporine, leziune de reperfuzie renală, displazie renală, azotemie, ocluzie arterială bilaterală, nefropatie urică acută, hipovolemie, uropatie bilaterală obstructivă acută, nefropatie hipercalcemică, sindrom uremic hemolitic, retenție urinară acută, nefroscleroză malignă, glomeruloscleroză postpartum, sclerodermie, boală anti-GBM diferită de Goodpasture, poliarterită nodoasă microscopică, granulomatoză alergică, nefrită acută de iradiere, glomerulonefrită post-streptococică, macroglobulinemie Waldenstrom, nefropatie analgezică, fistulă arteriovenoasă, grefă arteriovenoasă, dializă, rinichi ectopic, rinichi spongios medular, osteodistrofie renală, rinichi unic, hidronefroză, microalbuminurie, uremie, hematurie, hiperlipidemie, hipoalbuminemie, lipidurie, acidoză, hiperpotasemie și edem. În unele cazuri, boala sau starea asociată rinichilor este boala renală cronică.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1 prezintă secvența de aminoacizi a precursorului nativ al izoformei B (scurtă) a receptorului TGFβ de tip II uman (hTβRII) (NP_003233.4). Linia continuă de subliniere indică domeniul extracelular (ECD) matur (resturile 23-159) și linia dublă de subliniere indică valina care este înlocuită în izoforma A (lungă). Linia de subliniere punctată indică liderul (resturile 1-22).

Figura 2 prezintă secvența de aminoacizi a precursorului nativ al izoformei A (lungă) a TβRII uman (NP_001020018.1). Linia continuă de subliniere indică ECD matur (resturile 23-184) și linia de subliniere dublă indică substituția izoleucinei generată prin splicing. Linia de subliniere punctată indică liderul (resturile 1-22).

5 **Figura 3** prezintă o comparație a secvențelor linkerilor celor cinci construcții TβRII diferiți.

Figurile 4A și 4B prezintă sub formă de tabel afinitățile de legare dintre TGFβ1 și TGFβ3 și unul dintre cei câțiva construcții proteici de fuziune TβRII-Fc diferiți.

Figurile 5A și 5C reprezintă grafic rezultatele analizelor cu gene reporter care testează afinitatea TGFβ1 pentru unul dintre cei câțiva construcții proteici de fuziune TβRII-Fc diferiți.

10 **Figurile 5B și 5D** reprezintă grafic rezultatele analizelor cu gene reporter care testează afinitatea TGFβ3 pentru unul dintre cei câțiva construcții proteici de fuziune TβRII-Fc diferiți.

Figurile 5E și 5F furnizează în formă de tabel datele de IC₅₀ de la aceleași experimente.

DESCRIEREA DETALIATĂ

15

1. Prezentare generală

Proteinele descrise aici sunt formele umane, dacă nu este menționat altfel. Referințele NCBI ale proteinelor sunt următoarele: izoforma A a TβRII uman (hTβRII_{lungă}), NP_001020018.1 și izoforma B a TβRII uman (hTβRII_{scurt}), (NP_003233.4). Secvențele proteinelor TβRII native de la om sunt expuse în

20

Figurile 1 și 2. În unele cazuri, proteinele TβRII sunt de la animale neumane așa cum sunt un șoarece, șobolan, vacă sau maimuță.

Superfamilia TGFβ conține o diversitate de factori de creștere care împart în comun elemente ale structurii și motive structurale. Aceste proteine sunt cunoscute a efectua efecte biologice asupra unei mari diversități de tipuri celulare, atât la vertebrate, cât și la nevertebrate. Membrii superfamiliei execută

25

funcții importante în timpul dezvoltării embrionare în formarea modelelor și specificarea tisulară și pot influența o diversitate de procese de diferențiere, incluzând adipogeneza, miogeneza, condrogeneza, cardiogeneza, hematopoieza, neurogeneza și diferențierea celulelor epiteliale. Prin modificarea activității unui membru al familiei TGFβ, este posibilă desori cauzarea unor modificări fiziologice semnificative

30

într-un organism. De exemplu, rasele bovine Piedmontese și Albastru Belgian poartă o mutație cu pierderea funcției în gena GDF8 (numită de asemenea miostatină) care cauzează o creștere marcată a masei musculare. Grobet și colab., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Similar, la oameni, alele inactive ale GDF8 sunt asociate cu masă musculară crescută și, este raportat, forță excepțională. Schuelke și colab., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

35

Semnalele TGFβ sunt mediate de complexe heteromericale ale receptorilor serin/ treonin kinază de tipul I (de exemplu TβRI) și de tipul II (de exemplu TβRII), care fosforilează și activează proteinele SMAD din avală de stimularea cu liganzi (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Acești receptori de tipul I și tipul II sunt proteine transmembranare, compuse dintr-un domeniu extracelular care leagă ligandul, cu o regiune bogată în cisteină, un domeniu transmembranar și un domeniu citoplasmatic cu specificitate prezisă pentru serină/treonină. Receptorii de Tipul I sunt esențiali pentru semnalizare; și

40

Receptorii de Tipul I și II formează un complex stabil după legarea liganzilor, ceea ce rezultă în fosforilarea receptorilor de tipul I de către receptorii de tipul II. TGFβ are trei izoforme mamifere, TGFβ1, TGFβ2 și TGFβ3, fiecare cu funcții in vivo diferite. Legarea TGFβ la TβRII este o etapă esențială pentru inițierea activării căii de semnalizare a TGFβ, care duce la fosforilarea SMAD2 și translocarea în nucleu a complexului SMAD2/SMAD4 activat pentru a modula exprimarea genică.

45

Astfel, în unele cazuri, dezvoltarea furnizează polipeptide TβRII ca antagoniști ai TGFβ1 sau TGFβ3 pentru utilizarea în tratamentul diferitelor afecțiuni asociate cu TGFβ1 sau TGFβ3. Deși nu este dorită limitarea prin orice mecanism de acțiune specific, este de așteptat ca astfel de polipeptide să acționeze prin legarea la TGFβ1 sau TGFβ3 și să inhibe capacitatea acestor liganzi de a forma complexe de semnalizare ternare.

50

Dezvoltarea furnizează proteine de fuziune care cuprind polipeptide TβRII și o parte heteroloagă (de exemplu, o parte Fc). În anumite cazuri, partea TβRII și partea heteroloagă sunt unite prin intermediul unui linker. Așa cum este descris mai detaliat mai jos, dezvoltarea demonstrează că proteinele de fuziune TβRII-Fc care cuprind linkerii de anumite lungimi (de exemplu, un linker care are 21 de aminoacizi) au fost în mod surprinzător capabile să lege TGFβ-1 și TGFβ-3 cu afinitate mai puternică decât proteinele de fuziune TβRII-Fc care au un linker de doar patru aminoacizi.

55

Termenii utilizați în această specificație au în general înțelesul lor obișnuit din domeniu, în contextul acestei dezvoltări și în contextul specific în care este utilizat fiecare termen. Anumiți termeni

sunt discutați mai jos sau în altă parte în specificație, pentru a se furniza o îndrumare suplimentară practicianului pentru descrierea compozițiilor și metodelor descrise aici și pentru modul de producere și utilizare al acestora. Întinderea sau înțelesul oricărei utilizări a unui termen vor fi evidente din contextul specific în care este utilizat termenul.

"Omolog", în toate formele sale gramaticale și variantele ortografice, se referă la relația dintre două proteine care au o "origine evolutivă comună", incluzând proteine din superfamilii din aceeași specie de organism, cât și proteine omoloage de la specii diferite de organisme. Astfel de proteine (și acizii nucleici care le codifică) au o omologie a secvenței, așa cum este reflectat de similaritatea secvenței lor, fie în ce privește procentul identității și prin prezența unor anumite resturi sau motive și unor poziții conservate.

Termenul "similaritate a secvenței" în toate formele sale gramaticale, se referă la gradul de identitate sau corespondență între secvențe de acizi nucleici sau de aminoacizi care pot sau nu să aibă în comun o origine evolutivă. Totuși, în utilizarea obișnuită și în cererea de față, termenul "omolog", atunci când este modificat cu un adjectiv așa cum este "înalt", se poate referi la o similaritate a secvenței și poate sau nu să se refere la o origine evolutivă comună.

Referitor la o secvență de polipeptidă (sau de nucleotide) de referință, "procentul (%) identității secvenței" sau "identice în procent (%)" este definit ca procentul resturilor de aminoacizi (sau acizi nucleici) dintr-o secvență candidat care sunt identice cu resturile de aminoacizi (sau de acizi nucleici) din secvența de polipeptidă (sau de nucleotide) de referință după alinierea secvențelor și introducerea întreruperilor, dacă sunt necesare, pentru a se obține procentul maxim al identității secvenței și fără să se considere orice substituții conservative ca parte a identității secvenței. Alinierea în scopul determinării procentului identității secvențelor de aminoacizi poate fi făcută în mai multe moduri cunoscute specialiștilor în domeniu, de exemplu, utilizând softuri pe calculator disponibile public, precum softurile BLAST, BLAST-2, ALIGN sau Megalign (DNASTAR). Specialiștii în domeniu pot determina parametrii adecvați pentru alinierea secvențelor, incluzând orice algoritmi necesari pentru a obține alinierea maximă pe toată lungimea secvențelor care sunt comparate. Totuși, pentru scopurile de aici valorile % identității secvenței de aminoacizi (a acidului nucleic) sunt generate utilizând programul de calculator pentru compararea secvențelor ALIGN-2. Programul de calculator pentru compararea secvențelor ALIGN-2 a fost creat de Genentech, Inc., și codul sursă a fost înregistrat împreună cu documentația pentru utilizatori la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, unde este înregistrat sub Nr. de înregistrare TXU510087 al U.S. Copyright. Programul ALIGN-2 este disponibil public de la Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. Sau poate fi compilat din codul sursă. Programul ALIGN-2 ar trebui compilat pentru utilizare pe un sistem de operare UNIX, incluzând UNIX digital V4.0D. Toți parametrii pentru compararea secvențelor sunt fixați de programul ALIGN-2 și nu variază.

"Agoniza", în toate formele sale gramaticale, se referă la procesul de activare a unei proteine și/sau gene (de exemplu, prin activarea sau amplificarea exprimării proteinei de către acea genă sau prin inducerea intrării unei proteine inactive într-o stare activă) sau de creștere a activității proteinei și/sau genei.

"Antagoniza", în toate formele sale gramaticale, se referă la procesul de inhibare a unei proteine și/sau gene (de exemplu, prin inhibarea sau scăderea exprimării proteinei de către acea genă sau prin inducerea intrării unei proteine active într-o stare inactivă) sau o scădere a activității proteinei și/sau genei.

Așa cum sunt utilizați referitor la o valoare numerică din specificație și revendicări, termenii "în jur de" și "aproximativ" indică un interval de acuratețe, familiar și acceptabil pentru specialistul în domeniu.

Intervalele numerice dezvăluite aici includ numerele care definesc intervalele.

Termenii "o" și "un" includ referințele la plural dacă nu este dictat altfel în mod clar de contextul în care este utilizat termenul. Termenii "o" (sau "un"), ca și termenii "una sau mai multe" și "cel puțin o" pot fi utilizați aici interschimbabil. Suplimentar, acolo unde este utilizat aici, "și/sau" trebuie interpretat ca dezvăluirea specifică a fiecăreia dintre cele două sau mai multe caracteristici sau componente menționate, cu sau fără celelalte. Astfel, așa cum este utilizat într-o sintagmă precum "A și/sau B", termenul "și/sau" din aceasta este intenționat a include "A și B," "A sau B," "A" (singur) și "B" (singur). De asemenea, așa cum este utilizat într-o sintagmă precum "A, B și/sau C", termenul "și/sau" este intenționat a cuprinde oricare dintre următoarele aspecte: A, B și C; A, B sau C; A sau C; A sau B; B sau C; A și C; A și B; B și C; A (singur); B (singur); și C (singur).

Pe întinderea acestei specificații, cuvântul "cuprind" sau variații precum "cuprinde" sau "care cuprinde" vor fi înțelese a implica includerea unui întreg sau grup de întregi menționați dar nu excluderea oricărui alt întreg sau grup de întregi. Așa cum este aici, termenul "cuprinde" înglobează de asemenea utilizarea termenilor mai restrânși "care constă în" și "care constă esențial din".

Termenul "care constă esențial din" este limitat la materialele sau etapele menționate și la cele care nu afectează consistent caracteristicile de bază și noi ale instanței, -lor dezvăluite aici.

Așa cum este utilizat aici, termenul "afinitate apreciabilă" înseamnă legarea cu o constantă de disociere (K_D) mai mică de 50 nM.

Termenii "polipeptidă", "oligopeptidă", "peptidă" și "proteină" sunt utilizați aici interschimbabil pentru a se referi la lanțuri de aminoacizi cu orice lungime. Lanțul poate fi liniar sau ramificat, poate cuprinde aminoacizi modificați, și/sau poate fi întrerupt de molecule diferite de aminoacizi. Termenii cuprind de asemenea un lanț de aminoacizi care a fost modificat natural sau prin intervenție; de exemplu, formarea legăturilor disulfurice, glicozilare, lipidare, acetilare, fosforilare sau orice altă manipulare sau modificare, așa cum este conjugarea cu o componentă de marcare. În definiție sunt incluse de asemenea, de exemplu, polipeptide care conțin unul sau mai mulți analogi ai unui aminoacid (incluzând, de exemplu, aminoacizi nenaturali, etc.), cât și alte modificări cunoscute în domeniu. Este înțeles că polipeptidele pot apărea ca lanțuri unice sau ca lanțuri asociate.

2. Polipeptide TβRII

Proteinele TβRII cu ocurență naturală sunt proteine transmembranare, cu o parte a proteinei situată în exteriorul celulei (partea extracelulară) și o parte a proteinei situată în interiorul celulei (partea intracelulară). Cazuri ale dezvăluirii prezente cuprind variante de polipeptide TβRII care cuprind mutații în domeniul extracelular și/sau părți trunchiate ale domeniului extracelular al TβRII. Așa cum este descris mai sus, TβRII uman apare în natură în cel puțin două izoforme - A (lungă) și B (scurtă) – generate prin splicingul alternativ al domeniului extracelular (ECD) (Figurile 1 și 2 și SEQ ID NO: 1 și 2). SEQ ID NO: 27, care corespunde resturilor 23-159 din SEQ ID NO: 1, prezintă domeniul extracelular nativ de lungime integrală al izoformei scurte a TβRII. SEQ ID NO: 18, care corespunde resturilor 23-184 din SEQ ID NO: 2, ezintă domeniul extracelular nativ de lungime integrală al izoformei lungi a TβRII. Dacă nu este menționat altfel, număratoarea pozițiilor de aminoacizi pentru variantele bazate pe izoformele scurtă și lungă ale TβRII se referă la poziția corespondentă din precursorii nativi, SEQ ID NO: 1 și, respectiv, SEQ ID NO: 2.

În unele cazuri, dezvăluirea furnizează variante de polipeptide TβRII. O polipeptidă TβRII conform dezvăluirii poate lega și inhiba funcția unui membru al superfamiliei TGFβ, așa cum sunt, dar nelimitat la, TGFβ1 sau TGFβ3. Polipeptidele TβRII pot include o polipeptidă care constă în, sau care cuprinde, o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% și opțional identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% cu un domeniu ECD trunchiat al unei polipeptide TβRII cu ocurență naturală, al cărei capăt C-terminal este la nivelul oricăruia dintre aminoacizii 153-159 din SEQ ID NO: 1. Polipeptidele TβRII pot include o polipeptidă care constă în, sau care cuprinde, o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% și opțional identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% cu un domeniu ECD trunchiat al unei polipeptide TβRII cu ocurență naturală, al cărei capăt C-terminal este la nivelul oricăruia dintre aminoacizii 178-184 din SEQ ID NO: 2. În cazuri particulare, polipeptidele TβRII cuprind o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80%, și opțional identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18. Opțional, o polipeptidă TβRII nu include mai mult de 5 aminoacizi consecutivi, sau mai mult de 10, 20, 30, 40, 50, 52, 60, 70, 80, 90, 100, 150 sau 200 sau mai mulți aminoacizi consecutivi dintr-o secvență care constă în aminoacizii 160-567 din SEQ ID NO: 1 sau dintr-o secvență care constă în aminoacizii 185-592 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, polipeptida TβRII nu include aminoacizii 160-567 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, polipeptida TβRII nu include aminoacizii 1-22 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, polipeptida TβRII nu include aminoacizii 185-592 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, polipeptida TβRII nu include aminoacizii 1-22 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, polipeptida TβRII nu include aminoacizii 1-22 și 160-567 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, polipeptida TβRII nu include aminoacizii 185-592 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, polipeptida TβRII nu include aminoacizii 1-22 din SEQ ID NO: 2. În unele cazuri, polipeptida TβRII nu include aminoacizii 1-22 și 185-592 din SEQ ID NO: 2. Polipeptida TβRII neprocesată poate fie include, fie exclude, orice secvență semnal, cât și orice secvență N-terminal de secvența semnal. Așa cum este detaliat aici, capătul N-terminal al polipeptidei TβRII mature (procesate) poate fi localizat la nivelul oricăruia dintre aminoacizii 23-35 din SEQ ID NO: 1 sau 23-60 din SEQ ID NO: 2. Exemple de polipeptide TβRII mature includ, dar nu sunt limitate la, aminoacizii 23-159 din SEQ ID NO: 1 (expuși în SEQ ID NO: 27), aminoacizii 29-159 din SEQ ID NO: 1 (expuși în SEQ ID NO: 28), aminoacizii 35-159 din SEQ ID NO: 1 (expuși în SEQ ID NO: 29), aminoacizii 23-153 din SEQ ID NO: 1 (expuși în SEQ ID NO: 30), aminoacizii 29-153 din SEQ ID NO: 1 (expuși în SEQ ID NO: 31), aminoacizii 35-153 din SEQ ID NO: 1 (expuși în SEQ ID NO: 32), aminoacizii 23-184 din SEQ ID NO: 2 (expuși în SEQ ID NO: 18), aminoacizii 29-184 din SEQ ID NO: 2 (expuși în SEQ ID NO: 33), aminoacizii 60-184 din SEQ ID NO: 2 (expuși în SEQ ID NO: 29), aminoacizii 23-178 din SEQ ID NO: 2 (expuși în SEQ ID NO: 34), aminoacizii 29-178 din SEQ ID NO:

2 (expuși în SEQ ID NO: 35) și aminoacizii 60-178 din SEQ ID NO: 2 (expuși în SEQ ID NO: 32). Specialistul în domeniu va înțelege că variante corespunzătoare bazate pe izoforma lungă a TβRII vor include secvențe de nucleotide care codifică insertul de 25 de aminoacizi, împreună cu o substituție conservativă Val-Ile în poziția de flancare C-terminal de insert. Conform cu acestea, polipeptidele TβRII pot include părți extracelulare izolate ale polipeptidelor TβRII, incluzând izoformele scurte și lungi, variante ale acestora (incluzând variante care cuprind, de exemplu, nu mai mult de 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 sau 35 substituții de aminoacizi în secvența care corespunde aminoacizilor 23-159 din SEQ ID NO: 1 sau aminoacizilor 23-184 din SEQ ID NO: 2), fragmente ale acestora și proteine de fuziune care cuprind oricare dintre cele de mai sus, dar în fiecare caz, preferabil, oricare dintre polipeptidele TβRII de mai sus vor păstra o afinitate substanțială pentru cel puțin una dintre, sau ambele, TGFβ1 sau TGFβ3. În general, o polipeptidă TβRII va fi proiectată pentru a fi solubilă în soluții apoase la temperaturi, niveluri ale pH-ului și osmolarități relevante biologice.

În unele cazuri, variantele de polipeptide TβRII conform dezvăluirii cuprind una sau mai multe mutații în domeniul extracelular care le dau un profil modificat de legare a liganzilor. O polipeptidă TβRII poate include una, două, cinci sau mai multe modificări ale secvenței de aminoacizi comparativ cu partea corespunzătoare a unei polipeptide TβRII cu ocurență naturală. În unele cazuri, mutația duce la o substituție, inserție sau deleție în poziția care corespunde poziției 70 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, mutația duce la o substituție, inserție sau deleție în poziția care corespunde poziției 110 din SEQ ID NO: 1. Exemplele includ, dar nu sunt limitate la, o substituție N către D sau o substituție D către K în pozițiile care corespund pozițiilor 70 și, respectiv, 110 din SEQ ID NO: 1. Exemple de astfel de variante de polipeptide TβRII includ, dar nu sunt limitate la, secvențele expuse în SEQ ID NO: 36-39. O polipeptidă TβRII poate cuprinde o polipeptidă sau parte a acesteia care este codificată de oricare dintre SEQ ID NO: 10, 12, 14 sau 16, sau variante silențioase ale acestora sau acizi nucleici care hibridizează cu complementul acestora în condiții stricte de hibridizare. În cazuri particulare, o polipeptidă TβRII poate cuprinde o polipeptidă sau parte a acesteia care este codificată de oricare dintre SEQ ID NO: 12, sau variante silențioase ale acestora sau acizi nucleici care hibridizează cu complementul acestora în condiții stricte de hibridizare.

În unele cazuri, variantele de polipeptide TβRII conform dezvăluirii cuprind suplimentar o inserție de 36 aminoacizi (SEQ ID NO: 41) între perechea de resturi de glutamat (pozițiile 151 și 152 din SEQ ID NO: 1, sau pozițiile 176 și 177 din SEQ ID NO: 2) localizată în apropierea capătului C-terminal al ECD al TβRII, așa cum are loc natural în izoforma umană C a TβRII (Konrad și colab., BMC Genomics 8:318, 2007).

Dezvăluirea demonstrează suplimentar că polipeptidele TβRII pot fi modificate pentru a antagoniza selectiv liganzi ai TβRII. Restul N70 reprezintă un posibil situs de glicozilare. În unele cazuri, polipeptidele TβRII sunt aglicozilate. În unele cazuri, polipeptidele TβRII sunt aglicozilate sau au glicozilare redusă în poziția Asn157. În unele cazuri, polipeptidele TβRII sunt aglicozilate sau au glicozilare redusă în poziția Asn73.

În unele cazuri, o polipeptidă TβRII leagă TGFβ1 și polipeptida TβRII nu prezintă o legare substanțială la TGFβ3. În unele cazuri, o polipeptidă TβRII leagă TGFβ3 și polipeptida TβRII nu prezintă o legare substanțială la TGFβ1. Legarea poate fi evaluată utilizând proteine purificate în soluție sau într-un sistem de rezonanță a plasmonilor de suprafață, așa cum este un sistem Biacore™.

În unele cazuri, o polipeptidă TβRII inhibă semnalizarea celulară prin TGFβ1 și polipeptida TβRII are un efect inhibitor intermediar sau limitat asupra semnalizării prin TGFβ3. În unele cazuri, o polipeptidă TβRII inhibă semnalizarea prin TGFβ3 și polipeptida TβRII are un efect inhibitor intermediar sau limitat asupra semnalizării prin TGFβ1. Efectul inhibitor asupra semnalizării celulare poate fi evaluat prin metode cunoscute în domeniu.

Împreună, o parte activă a unei polipeptide TβRII poate cuprinde secvențele de aminoacizi 23-153, 23-154, 23-155, 23-156, 23-157 sau 23-158 din SEQ ID NO: 1, cât și variante ale acestor secvențe începând cu oricare dintre aminoacizii 24-35 din SEQ ID NO: 1. Similar, o parte activă a unei polipeptide TβRII poate cuprinde secvențele de aminoacizi 23-178, 23-179, 23-180, 23-181, 23-182 sau 23-183 din SEQ ID NO: 2, cât și variante ale acestor secvențe începând cu oricare dintre aminoacizii 24-60 din SEQ ID NO: 2. Polipeptide TβRII exemplificatorii cuprind secvențele de aminoacizi 29-159, 35-159, 23-153, 29-153 și 35-153 din SEQ ID NO: 1 sau secvențele de aminoacizi 29-184, 60-184, 23-178, 29-178 și 60-178 din SEQ ID NO: 2. Sunt considerați de asemenea variante în aceste intervale, în special cele care au o identitate de cel puțin 80%, 85%, 90%, 95% sau 99% cu partea corespunzătoare din SEQ ID NO: 1 sau SEQ ID NO: 2. Poate fi selectată o polipeptidă TβRII care nu include secvența care constă în aminoacizii 160-567 din SEQ ID NO: 1 sau aminoacizii 185-592 din SEQ ID NO: 2. În cazuri particulare, polipeptidele TβRII cuprind o secvență de aminoacizi identică cel puțin 80% și, opțional, identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18.

Așa cum este descris mai sus, dezvăluirea furnizează polipeptide TβRII care au în comun un grad menționat al identității sau similarității secvenței cu o polipeptidă TβRII cu ocurență naturală. Pentru a determina procentul identității a două secvențe de aminoacizi, secvențele sunt aliniate în scopul comparației optime (de exemplu, pot fi introduse întreruperi în una sau amândouă dintre o primă și o a doua secvență de aminoacizi sau acizi nucleici pentru alinierea optimă și, în scopul comparării, secvențele ne-omoloage pot fi ignorate). Sunt apoi comparate resturile de aminoacizi din pozițiile corespondente ale aminoacizilor. Atunci când o poziție din prima secvență este ocupată de același rest de aminoacid ca și în poziția corespondentă din a doua secvență, moleculele sunt identice în acea poziție (așa cum este utilizat aici, "identitate" a aminoacizilor este echivalent cu "omologie" a aminoacizilor). Procentul identității dintre cele două secvențe este o funcție a numărului de poziții identice împărțite în comun de secvențe, luând în considerare numărul de întreruperi, și lungimea fiecărei întreruperi care trebuie introdusă pentru alinierea optimă a celor două secvențe.

Compararea secvențelor și determinarea procentului identității și similarității dintre cele două secvențe poate fi realizată utilizând un algoritm matematic (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., și Griffin, H. G., ed., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; și Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. și Devereux, J., ed., M Stockton Press, New York, 1991).

Într-un caz, procentul identității dintre două secvențe de aminoacizi este determinat utilizând algoritmul din Needleman și Wunsch (J Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) care a fost incorporat în programul GAP din pachetul software GCG (disponibil la <http://www.gcg.com>). Într-un caz particular, sunt utilizați următorii parametri pentru programul GAP: fie o matrice Blosum 62, fie o matrice PAM250 matrix, și o pondere a întreruperii de 16, 14, 12, 10, 8, 6 sau 4 și o pondere a lungimii de 1, 2, 3, 4, 5 sau 6. În încă un alt caz, procentul identității dintre două secvențe de nucleotide este determinat utilizând programul GAP din pachetul software GCG (Devereux, J., și colab., Nucleic Acids Res. 12(1):387 (1984)) (disponibil la <http://www.gcg.com>). Parametri exemplificatori includ utilizarea unei matrici NWSgapdna.CMP și unei ponderi pentru întrerupere de 40, 50, 60, 70 sau 80 și o pondere a lungimii de 1, 2, 3, 4, 5 sau 6. Dacă nu este menționat altfel, procentul identității dintre două secvențe de aminoacizi va fi determinat utilizând programul GAP care utilizează o matrice Blosum 62, o pondere a întreruperii de 10 și o pondere a lungimii de 3, și dacă un astfel de algoritm nu poate calcula procentul identității dorit, ar trebui selectată o alternativă adecvată dezvăluită aici.

Într-un alt caz, procentul identității dintre două secvențe de aminoacizi este determinat utilizând algoritmul din E. Myers și W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) care a fost incorporat în programul ALIGN (versiunea 2.0), utilizând un tabel pentru ponderea resturilor PAM120, o penalizare pentru lungimea întreruperii de 12 și o penalizare a întreruperii de 4.

Un alt caz de determinare a celei mai bune alinieri generale dintre două secvențe de aminoacizi poate fi determinat utilizând programul pe calculator FASTDB bazat pe algoritmul din Brutlag și colab. (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). Într-o aliniere a secvențelor, secvențele de interogare și subiect sunt amândouă secvențe de aminoacizi. Rezultatul alinierii globale a secvențelor menționată este prezentat ca procent al identității. Într-un caz, identitatea secvenței de aminoacizi este obținută utilizând programul pe calculator FASTDB bazat pe algoritmul din Brutlag și colab. (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). Într-un caz particular, parametri utilizați pentru a calcula procentul identității și similarității pentru o aliniere a aminoacizilor cuprind: Matrice = PAM 150, k-tuplu = 2, Penalizare pentru nepotrivire = 1, Penalizare de unire = 20, Lungime grupului de randomizare = 0, Scor prag = 1, Penalizare pentru întrerupere = 5 și Penalizare pentru lungimea întreruperii = 0,05.

Polipeptidele TβRII pot include suplimentar la capătul N-terminal oricare dintre diferitele secvențe lider. O astfel de secvență ar permite peptidelor să fie exprimate și ținute către calea de secreție dintr-un sistem eucariot. Vezi, de exemplu, Ernst și colab., Brevetul U.S. Nr. 5.082.783 (1992). Alternativ, pentru a se conduce eliberarea din celulă, poate fi utilizată o secvență semnal nativă pentru TβRII. Secvențe lider posibile includ lideri nativi, al activatorului tisular al plasminogenului (TPA) și melitinei de la albine (SEQ ID NO. 22-24, respectiv). Exemple de proteine de fuziune TβRII-Fc care incorporează o secvență lider de la TPA includ SEQ ID NO: 11, 13, 15 și 17. Procesarea peptidelor semnal poate diferi, printre alte variabile, în funcție de secvența lider aleasă, tipul celular utilizat și condițiile de cultură și, prin urmare, situsurile N-terminale inițiale reale ale polipeptidelor TβRII mature se pot decala cu 1, 2, 3, 4 sau 5 aminoacizi în oricare dintre direcțiile N-terminal sau C-terminal. Exemple de proteine de fuziune TβRII-Fc includ SEQ ID NO: 11, 13, 15 și 17. Specialistul în domeniu va înțelege că variante corespunzătoare bazate pe izoforma lungă a TβRII vor include insertul de 25 de aminoacizi împreună cu o substituție conservativă Val-Ile în poziția de flancare C-terminală de insert.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele T β R β II dezvăluite aici au o identitate de cel puțin 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 97%, 99% sau 100% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51, dar sunt lipsite de unul sau mai mulți aminoacizi N-terminali comparativ cu secvențele de aminoacizi din SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51. În unele cazuri, polipeptidei T β R β II îi lipsește aminoacidul care corespunde primului aminoacid (treonină) din oricare dintre SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51. În unele cazuri, polipeptidei T β R β II îi lipsesc aminoacizii care corespund primului și celui de-al doilea aminoacid (treonină și, respectiv, izoleucină) din oricare dintre SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51. În unele cazuri, polipeptidei T β R β II îi lipsesc aminoacizii care corespund primului, celui de-al doilea și celui de-al treilea aminoacid (treonină, izoleucină și, respectiv, prolină) din oricare dintre SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51. În unele cazuri, polipeptidei T β R β II îi lipsesc aminoacizii care corespund primului, celui de-al doilea, celui de-al treilea și celui de-al patrulea aminoacid (treonină, izoleucină, prolină, respectiv, prolină) din oricare dintre SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele T β R β II dezvăluite aici sunt identice cel puțin 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 97%, 99% sau 100% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 18 sau 51, dar sunt lipsite de aminoacidul corespunzător primului aminoacid (treonină) din SEQ ID NO: 18 sau 51. În unele cazuri, polipeptidei T β R β II îi lipsesc aminoacizii care corespund primului și celui de-al doilea aminoacid (treonină și, respectiv, izoleucină) din SEQ ID NO: 18 sau 51. În unele cazuri, polipeptidei T β R β II îi lipsesc aminoacizii care corespund primului, celui de-al doilea și celui de-al treilea aminoacid (treonină, izoleucină și, respectiv, prolină) din SEQ ID NO: 18 sau 51. În unele cazuri, polipeptidei îi lipsesc aminoacizii care corespund primului, celui de-al doilea, celui de-al treilea și celui de-al patrulea aminoacid (treonină, izoleucină, prolină, respectiv, prolină) din SEQ ID NO: 18 sau 51.

În unele cazuri, dezvăluirea furnizează o compoziție care cuprinde un amestec de polipeptide T β R β II, unde polipeptidele T β R β II din compoziție cuprind fiecare o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 97%, 99% sau 100% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51; dar unde cel puțin o parte a polipeptidelor T β R β II din compoziție (de exemplu, cel puțin 1%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) includ aminoacizii care corespund primului, celui de-al doilea, celui de-al treilea și celui de-al patrulea aminoacid (treonină, izoleucină, prolină și, respectiv, prolină) din oricare dintre SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51; și unde cel puțin unei părți a polipeptidelor T β R β II din compoziție (de exemplu, cel puțin 1%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) le lipsește unul sau mai mulți dintre aminoacizii care corespund primului, celui de-al doilea, celui de-al treilea și celui de-al patrulea aminoacid (treonină, izoleucină, prolină și, respectiv, prolină) din oricare dintre SEQ ID NO: 18, 27, 30, 34, 36, 37, 38, 39, 48, 49 sau 51. În unele cazuri, dezvăluirea furnizează o compoziție care cuprinde un amestec de polipeptide T β R β II, unde polipeptidele T β R β II sunt identice cel puțin 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 97%, 99% sau 100% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 18 sau 51, dar unde cel puțin de la 30% la 80% dintre polipeptidele T β R β II din compoziție sunt lipsite de aminoacidul care corespunde primului aminoacid (treonină) din SEQ ID NO: 18 sau 51.

În unele cazuri, dezvăluirea de față consideră mutații specifice ale polipeptidelor T β R β II astfel încât să fie modificată glicozilarea polipeptidei. Astfel de mutații pot fi selectate pentru a se introduce sau elimina unul sau mai multe situsuri de glicozilare, așa cum sunt situsuri de glicozilare legată la O sau legată la N. Situsurile de recunoaștere pentru glicozilarea legată la asparagină cuprind în general o secvență tripeptidică, asparagină-X-treonină (sau asparagină-X-serină) (unde "X" este orice aminoacid) care este recunoscută specific de enzimele celulare de glicozilare adecvate. Modificarea poate fi făcută, de asemenea, prin adăugarea a, sau substituirea cu, unul sau mai multe resturi de serină sau treonină în secvența polipeptidei T β R β II de tip sălbatic (pentru situsuri de glicozilare legată la O). O diversitate de substituții sau deleții de aminoacizi la nivelul uneia sau ambelor dintre prima și a treia poziție a aminoacizilor dintr-un situs de recunoaștere pentru glicozilare (și/sau deleția aminoacidului din a doua poziție) duc la neglicozilare la nivelul secvenței tripeptidice modificate. Un alt mod de creștere a numărului de fracțiuni carbohidrat de pe o polipeptidă T β R β II este prin cuplarea chimică sau enzimatică a glicozidelor la polipeptida T β R β II. În funcție de metoda de cuplare utilizată, zaharul, -ile pot fi atașate la (a) arginină și histidină; (b) grupări carboxil libere; (c) grupări sulfhidril libere, așa cum sunt cele din cisteină; (d) grupări hidroxil libere așa cum sunt cele din serină, treonină sau hidroxiprolină; (e) resturi aromatice așa cum sunt cele ale fenilalaninei, tirozinei sau triptofanului; sau (f) grupării amidice a glutaminei. Aceste metode sunt descrise în WO 87/05330 publicat la 11 Sept. 1987, și în Aplin și Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. Îndepărtarea uneia sau mai multor fracțiuni de carbohidrat prezente pe o polipeptidă T β R β II poate fi făcută chimic și/sau enzimatic. Deglicozilarea chimică poate

implica, de exemplu, expunerea polipeptidei T β R β II la compusul acid trifluorometansulfonic sau la un compus echivalent. Acest tratament rezultă în scindarea majorității sau tuturor zaharurilor cu excepția zaharului de legare (N-acetilglucozamină sau N-acetilgalactozamină), păstrând concomitent intactă secvența de aminoacizi. Deglicozilarea chimică este descrisă suplimentar de Hakimuddin și colab. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 și de Edge și colab. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Scindarea enzimatică a fracțiunilor de carbohidrat de pe polipeptidele T β R β II poate fi obținută prin utilizarea unei diversități de endo- și exo-glicozidaze, așa cum este descris de Thotakura și colab. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Secvența unei polipeptide T β R β II poate fi corectată, după cum este adecvat, în funcție de tipul sistemului de exprimare utilizat, deoarece celulele mamifere, de drojdie, insecte și plante pot introduce fiecare modele diferite de glicozilare care pot fi afectate de secvența de aminoacizi a peptidului. În general, polipeptidele T β R β II pentru utilizarea la om vor fi exprimate într-o linie celulară mamiferă care furnizează o glicozilare adecvată, așa cum sunt liniile celulare HEK293 sau CHO, deși este de așteptat să fie utile și alte linii celulare de exprimare mamifere, linii celulare de drojdie cu enzime de glicozilare introduse prin inginerie și celule de insecte.

Dezvăluirea consideră suplimentar o metodă de generare a mutanților, în special seturi de mutanți combinatoriali ai unei polipeptide T β R β II, cât și mutanți de trunchiere; colecțiile de mutanți combinatoriali sunt utile în special pentru identificarea secvențelor variante funcționale. Scopul screeningului unor astfel de biblioteci combinatoriale poate fi acela al generării, de exemplu, al variațiilor de polipeptide T β R β II care pot acționa fie ca agoniști, fie ca antagoniști sau, alternativ, care au activități cu totul noi. Mai jos sunt descrise o diversitate de analize de screening și astfel de analize pot fi utilizate pentru a evalua variații. De exemplu, poate fi făcut screeningul unui variant de polipeptidă T β R β II pentru capacitatea sa de a lega un ligand al T β R β II, de a preveni legarea unui ligand al T β R β II la o polipeptidă T β R β II sau de a interfera cu semnalizarea cauzată de un ligand al T β R β II. Activitatea unei polipeptide T β R β II sau a variațiilor săi poate fi testată de asemenea într-o analiză bazată pe celule sau in vivo, în special oricare dintre analizele dezvăluite în Exemple.

Pot fi generate variante derivate combinatorial care au o potență selectivă sau crescută în general comparativ cu o polipeptidă T β R β II care cuprinde un domeniu extracelular al unei polipeptide T β R β II cu ocurență naturală. Similar, mutageneza poate da naștere unor variante care au perioade de înjumătățire serică diferite dramatic față de cea a polipeptidei T β R β II de tip sălbatic corespondente. De exemplu, proteina modificată poate fi făcută fie mai stabilă fie mai puțin stabilă la degradarea proteolitică sau la alte procese care duc la distrugerea, sau eliminarea de altă natură sau inactivarea, unei polipeptide T β R β II nativă. Astfel de variante și genele care le codifică, pot fi utilizate pentru a modifica nivelurile polipeptidei T β R β II prin reglarea perioadei de înjumătățire a polipeptidelor T β R β II. De exemplu, o perioadă de înjumătățire scurtă poate da naștere unor efecte biologice mai trecătoare și poate permite un control mai precis al nivelurilor polipeptidelor T β R β II recombinante din pacient. Pentru a se modifica perioada de înjumătățire a proteinei, într-o proteină de fuziune cu Fc, pot fi făcute mutații în linker (dacă este prezent) și/sau în partea Fc.

Poate fi produsă o bibliotecă combinatorială prin intermediul unei biblioteci degenerate de gene care codifică o bibliotecă de polipeptide care includ fiecare cel puțin o parte de posibile secvențe pentru polipeptide T β R β II. De exemplu, în secvențele genice poate fi ligat enzimatic un amestec de oligonucleotide sintetice astfel încât setul degenerat de secvențe de nucleotide pentru posibile polipeptide T β R β II să fie exprimabile ca polipeptide individuale sau, alternativ, ca set de proteine de fuziune mai mari (de exemplu, pentru prezentarea pe fagi).

Există multe metode de generare a bibliotecii de variante posibile de polipeptide T β R β II dintr-o secvență de oligonucleotide degenerată. Sinteza chimică a unei secvențe genice degenerate poate fi realizată cu un sintetizator automat de ADN și genele sintetice pot fi apoi legate într-un vector adecvat pentru exprimare. Sinteza oligonucleotidelor degenerate este bine cunoscută în domeniu (vezi de exemplu, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura și colab., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura și colab., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura și colab., (1984) Science 198:1056; Ike și colab., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Astfel de tehnici au fost utilizate pentru evoluția direcționată a altor proteine (vezi, de exemplu, Scott și colab., (1990) Science 249:386-390; Roberts și colab., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin și colab., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla și colab., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; cât și Brevetele U.S. Nr.: 5.223.409, 5.198.346 și 5.096.815).

Alternativ, pentru a se genera o bibliotecă combinatorială pot fi utilizate alte forme de mutageneză. De exemplu, variante de polipeptide T β R β II pot fi generate și izolate dintr-o bibliotecă prin screening, utilizând, de exemplu, mutageneza cu scanare cu alanină și asemănătoare (Ruf și colab., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang și colab., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint și colab., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg și colab., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima și

colab., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman și colab., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; și Cunningham și colab., (1989) Science 244:1081-1085), prin mutageneza de scanare cu linker (Gustin și colab., (1993) Virology 193:653-660; Brown și colab., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight și colab., (1982) Science 232:316); prin mutageneză prin saturație (Meyers și colab., (1986) Science 232:613); prin mutageneză PCR (Leung și colab., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); sau prin mutageneză aleatoare, incluzând mutageneza chimică, etc. (Miller și colab., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; și Greener și colab., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). Mutageneza cu scanarea cu linker, este o metodă atractivă pentru identificarea formelor trunchiate (bioactive) ale polipeptidelor T β RII, în special în contextul combinatorial.

În domeniu este cunoscută o gamă largă de tehnici pentru screeningul produșilor genici ai bibliotecilor combinatoriale produși prin mutații punctiforme și trunchieri și, de fapt, pentru screeningul pentru produși genici care au o anumită proprietate din bibliotecile de ADNc. Astfel de tehnici vor putea fi în general adaptate pentru screeningul rapid al bibliotecilor de gene generate prin mutageneza combinatorială a polipeptidelor T β RII. Tehnicile cele mai larg utilizate pentru screeningul bibliotecilor mari de gene cuprind caracteristic clonarea bibliotecii de gene în vectori de exprimare replicabili, transformarea celulelor adecvate cu biblioteca de vectori rezultată și exprimarea genelor combinatoriale în condiții în care detectarea unei activități dorite înlesnește izolarea relativ ușoară a vectorului care codifică gena a cărei produs a fost detectat. Analize preferate includ analize de legare a ligandului de către T β RII și analize ale semnalizării celulare mediate de ligand.

În unele cazuri, polipeptidele T β RII conform dezvoltării pot cuprinde modificări post-translazionale suplimentare în plus față de oricare sunt prezente în mod natural în polipeptidele T β RII. Astfel de modificări includ, dar nu sunt limitate la, acetilare, carboxilare, glicozilare, fosforilare, lipidare, pegilare (polietilen glicol) și acilare. Ca rezultat, polipeptidele T β RII modificate pot conține elemente diferite de aminoacizi, așa cum sunt polietilen glicoli, lipide, mono- sau poli-zaharide și fosfați. Efectele unor astfel de elemente diferite de aminoacizi asupra funcționalității unei polipeptide T β RII pot fi testate așa cum este descris aici pentru alte variante de polipeptide T β RII. Atunci când polipeptidă T β RII este produsă în celule prin scindarea unei forme nascente a polipeptidei T β RII, procesarea post-translațională poate fi importantă de asemenea pentru plierea și/sau funcția corecte ale proteinei. Celule diferite (așa cum sunt CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 sau HEK-293) au mecanisme celulare specifice și mecanisme caracteristice pentru astfel de activități post-translazionale și pot fi alese pentru a se asigura modificarea și procesarea corecte a polipeptidelor T β RII.

3. Linkeri

Dezvăluirea furnizează proteine de fuziune cu T β RII și, în aceste cazuri, partea T β RII este conectată la partea heteroloagă (de exemplu, partea Fc) prin intermediul unui linker. În unele cazuri, linkerii sunt linkeri bogați în glicină și serină. În secvența de linker pot fi utilizați de asemenea alți aminoacizi apropiați neutri, așa cum sunt, dar ne limitat la, Thr, Asn, Pro și Ala. În unele cazuri, linkerul cuprinde diferite permutări de secvențe de aminoacizi care conțin Gly și Ser. În unele cazuri, linkerul are o lungime mai mare de 10 aminoacizi. În cazuri suplimentare, linkerii au o lungime de cel puțin 12, 15, 20, 21, 25, 30, 35, 40, 45 sau 50 de aminoacizi. În unele cazuri, linkerul este mai scurt de 40, 35, 30, 25, 22 sau 20 de aminoacizi. În unele cazuri, linkerul are lungime de 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-21, 10-15, 10, 15-25, 17-22, 20 sau 21 de aminoacizi. În cazuri preferate, linkerul cuprinde secvența de aminoacizi GlyGlyGlyGlySer (GGGGS) (SEQ ID NO: 19) sau repetiții ale acesteia (GGGGS) $_n$, în care $n \geq 2$. În cazuri particulare $n \geq 3$ sau $n = 3-10$. Cererea învață descoperirea surprinzătoare conform căreia proteinele care cuprind o parte T β RII și o parte heteroloagă fuzionate împreună prin intermediul unui linker (GGGGS) $_4$ au fost asociate cu o afinitate mai puternică pentru TGF β 1 și TGF β 3 comparativ cu o proteină de fuziune cu T β RII în care $n < 4$. Astfel, în cazuri preferate, $n \geq 4$ sau $n = 4-10$. Cererea învață de asemenea că proteinele care cuprind linkeri (GGGGS) $_n$ în care $n > 4$ au avut proprietăți inhibitoare similare cu proteinele care au linkerul (GGGGS) $_4$. Astfel, în unele cazuri, într-un linker (GGGGS) $_n$ linker, n nu este mai mare de 4. În unele cazuri, $n = 4-10$, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-8, 5-7 sau 5-6. În unele cazuri, $n = 3, 4, 5, 6$ sau 7. În cazuri particulare, $n = 4$. În unele cazuri, un linker care cuprinde o secvență (GGGGS) $_n$ cuprinde de asemenea o treonină N-terminală. În unele cazuri, linkerul este oricare dintre următoarele:

GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 21)

TGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 4)

TGGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 5)

TGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 6)

TGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 25)

TGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 26) sau

În unele cazuri, linkerul cuprinde secvența de aminoacizi din TGGGPKNSCDK (SEQ ID NO: 7). În unele cazuri, linkerul este oricare dintre SEQ ID NO: 21, 4-7, 25-26 sau 40, căruia îi lipsește o treonină N-terminală. În unele cazuri, linkerul nu cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 26 sau 40.

În unele cazuri, variantele funcționale sau formele modificate ale polipeptidelor TβRII includ proteine de fuziune care au cel puțin o parte de polipeptidă TβRII și una sau mai multe părți heteroloage. Exemple bine cunoscute de astfel de părți heteroloage includ, dar nu sunt limitate la, polihistidină, Glu-Glu, glutathion S transferaza (GST), tioredoxina, proteina A, proteina G, o regiune constantă a lanțului greu de imunoglobulină (Fc), proteina de legare a maltozei (MBP) sau albumina serică umană. O parte heteroloagă poate fi selectată astfel încât să confere o proprietate dorită. De exemplu, unele părți heterologe sunt utile în special pentru izolarea proteinelor de fuziune prin cromatografie de afinitate. În scopul purificării prin afinitate, sunt utilizate matrici relevante pentru cromatografia de afinitate, așa cum sunt răși conjugate cu glutathion, amilază și nichel sau cobalt. Multe astfel de matrici sunt disponibile sub formă de "kit", așa cum este sistemul de purificare Pharmacia GST și sistemul QIAexpress™ (Qiagen) util pentru partenerii de fuziune cu (HIS₆). Ca alt exemplu, poate fi selectată o parte heteroloagă astfel încât să se înlesnească detecția polipeptidelor TβRII. Exemple de astfel de domenii de detecție includ diferitele proteine fluorescente (de exemplu, GFP) cât și "etichete epitop" care sunt de obicei secvențe peptidice scurte pentru care este disponibil un anticorp specific. Etichete epitop bine cunoscute pentru care sunt ușor disponibili anticorpi monoclonali specifici includ etichete FLAG, hemaglutinina virusului gripa (HA), și c-myc. În unele cazuri, părțile heteroloage au un situs de scindare pentru proteaze, așa cum este pentru Factorul Xa sau Trombină, ceea ce permite proteazei respective să digere parțial proteinele de fuziune și să elibereze prin urmare proteinele recombinante din acestea. Proteinele eliberate pot fi apoi izolate de partea heteroloagă prin separare cromatografică ulterioară. În anumite cazuri preferate, o polipeptidă TβRII este fuzionată cu un domeniu care stabilizează polipeptida TβRII in vivo (un domeniu "stabilizator"). Prin "stabilizator" se înțelege orice care crește perioada de înjumătățire serică, indiferent dacă aceasta este din cauza distrugerii scăzute, clearanței renale scăzute sau altui efect farmacocinetic. Fuziunile cu partea Fc a unei imunoglobuline sunt cunoscute a conferi unei game largi de proteine proprietăți farmacocinetice de dorit. De asemenea, pot conferi proprietăți de dorit fuziunile la albumina serică umană. Alte tipuri de părți heteroloage care pot fi selectate includ domenii de multimerizare (de exemplu, dimerizare, tetramerizare) și domenii funcționale.

Ca exemple specifice, dezvăluirea de față furnizează proteine de fuziune care cuprind variante de polipeptide TȚRII fuzionate la o secvență a domeniului Fc din SEQ ID NO: 20. Opțional, domeniul Fc are una sau mai multe mutații la nivelul resturilor așa cum sunt Asp-265, Lys-322 și Asn-434 (numărate în conformitate cu IgG de lungime integrală corespunzătoare). În anumite cazuri, domeniul Fc mutant care are una sau mai multe dintre aceste mutații (de exemplu, mutația Asp-265) are capacitate redusă de a lega receptorul pentru Fcy comparativ cu un domeniu Fc de tip sălbatic. În alte cazuri, domeniul Fc mutant care are una sau mai multe dintre aceste mutații (de exemplu, mutația Asn-434) are o capacitate crescută de a lega receptorul pentru Fc înrudit cu MHC de clasa I (FcRN) comparativ cu un domeniu Fc de tip sălbatic.

Este înțeles că diferite elemente ale proteinelor de fuziune pot fi aranjate în orice mod care este în concordanță cu funcționalitatea dorită. De exemplu, o polipeptidă TβRII poate fi amplasată C-terminal față de un domeniu heterolog sau, alternativ, un domeniu heterolog poate fi amplasat C-terminal față de o polipeptidă TβRII. Nu este necesar ca domeniul de polipeptidă TβRII și domeniul heterolog dintr-o proteină de fuziune să fie adiacente și pot fi incluse domenii sau secvențe de aminoacizi suplimentare C- sau N-terminal de oricare domeniu sau între domenii.

Așa cum este utilizat aici, termenul "domeniu Fc de imunoglobulină" sau simplu "Fc" este înțeles să însemne partea carboxi-terminală a unei regiuni constante de lanț de imunoglobulină, preferabil, o regiune constantă a lanțului greu de imunoglobulină sau o parte a acesteia. De exemplu, o regiune Fc de imunoglobulină poate cuprinde 1) un domeniu CH1, un domeniu CH2 și un domeniu CH3, 2) un domeniu CH1 și un domeniu CH2, 3) un domeniu CH1 și un domeniu CH3, 4) un domeniu CH2 și un domeniu CH3 sau 5) o combinație de două sau mai multe domenii și o regiune balama de imunoglobulină. Într-un caz preferat, regiunea Fc de imunoglobulină cuprinde cel puțin o regiune balama de imunoglobulină, un domeniu CH2 și un domeniu CH3 și este preferabil lipsită de domeniul CH1. În unele cazuri, regiunea Fc de imunoglobulină este o regiune Fc de imunoglobulină umană.

Intr-un caz, clasa de imunoglobulină de la care este derivată regiunea constantă a lanțului greu este IgG (Igy) (subclasele γ 1, 2, 3 sau 4). Pot fi utilizate alte clase de imunoglobuline, IgA (Iga), IgD

(IgD), IgE (Ige) și IgM (Igu). Alegerea regiunii constante adecvate de lanț greu de imunoglobulină este discutată în detaliu în Brevetele U.S. Nr. 5.541.087 și 5.726.044. Alegerea secvențelor anumite de regiuni constante ale lanțului greu de imunoglobulină de la anumite clase și subclase de imunoglobuline pentru a se obține un anumit rezultat este considerată a se încadra în competența specialistului în domeniu. Partea constructului ADN care codifică regiunea Fc de imunoglobulină cuprinde preferabil cel puțin o parte a unui domeniu balama și, preferabil, cel puțin o parte a unui domeniu CH3 sau Fc gama sau domeniile omoloage din oricare dintre IgA, IgD, IgE sau IgM.

Suplimentar, este considerat că în practicarea metodelor și compozițiilor dezvăluite aici poate fi utilă substituția sau deleția unor aminoacizi din regiunile constante ale lanțurilor grele de imunoglobulină. Un exemplu ar fi introducerea substituțiilor de aminoacizi în regiunea CH2 superioară pentru a crea o variantă de Fc cu afinitate redusă pentru receptorii pentru Fc (Cole și colab. (1997) J. Immunol. 159:3613).

În unele cazuri, dezvăluirea furnizează proteine de fuziune cu polipeptide TβRII care cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 11, 13, 15 și 17 sau fragmente active biologic ale acestora. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 11, 13 și 15 sau fragmente active biologic ale acestora. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 13 sau un fragment activ biologic al acesteia. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 50 sau un fragment activ biologic al acesteia. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 51 sau un fragment activ biologic al acesteia. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 52 sau un fragment activ biologic al acesteia. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 53 sau un fragment activ biologic al acesteia. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 54 sau un fragment activ biologic al acesteia. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 55 sau un fragment activ biologic al acesteia. În unele cazuri, proteinele de fuziune cu polipeptide TβRII cuprind o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 56 sau un fragment activ biologic al acesteia. În unele cazuri, proteina de fuziune cu polipeptide TβRII cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20 sau un fragment activ biologic al acesteia.

În unele cazuri, proteinele de fuziune descrise aici au o afinitate de legare îmbunătățită pentru TGFβ1 și TGFβ3. În unele cazuri, o proteină de fuziune care cuprinde un linker cu lungime de cel puțin 10 aminoacizi (de exemplu, o proteină de fuziune care are secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 11, 13, 15 și 50-56) are o afinitate de legare îmbunătățită pentru TGFβ1 și TGFβ3 comparativ cu o proteină de fuziune de referință (de exemplu, o proteină de fuziune care are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 9). În unele forme de realizare, proteina de fuziune leagă TGFβ1 cu o K_D mai mică de 200 pM, mai mică de 150 pM, mai mică de 100 pM, mai mică de 75 pM, mai mică de 50 pM sau mai mică de 25 pM. În unele forme de realizare, proteina de fuziune leagă TGFβ3 cu o K_D mai mică de 75 pM, mai mică de 70 pM, mai mică de 60 pM, mai mică de 50 pM, mai mică de 40 pM, mai mică de 35 pM, mai mică de 25 pM, mai mică de 15, mai mică de 10 sau mai mică de 5 pM.

În unele forme de realizare oricare dintre polipeptidele dezvăluite aici inhibă TGFβ1 și/sau TGFβ3 într-o analiză măsurabilă. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ1 cu o IC_{50} mai mică de 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,08, 0,09, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03 sau 0,02 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele cazuri, polipeptida inhibă TGFβ3 cu o IC_{50} mai mică de 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03 sau 0,02 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter. În unele forme de realizare, analiza cu genă reporter este o analiză cu reporter CAGA. În unele cazuri, analiza cu CAGA se bazează pe o linie celulară

umană de carcinom pulmonar transfectată cu un plasmid reporter pGL3(CAGA)12 (Dennler și colab., 1998, EMBO 17: 3091-3100) cât și cu un plasmid reporter Renilla (pRLCMV) ca martor pentru eficiența transfecției. Motivul CAGA este prezent în promotorii gebelor de răspuns la TGFβ (de exemplu, PAI-1), prin urmare acest vector este pentru utilizarea generală în cazul factorilor care semnalizează prin SMAD2 și SMAD3. Vezi, de exemplu, Exemplul 2.

5. Polipeptide de fuziune

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează polipeptide de fuziune care conțin TβRII. Polipeptidele de fuziune pot fi produse conform oricăreia dintre metodele dezvoltate aici sau care sunt cunoscute în domeniu.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele de fuziune dezvoltate aici cuprinde următoarele componente: a) oricare dintre polipeptidele TβRII dezvoltate aici ("A"), b) oricare dintre linkerii dezvoltate aici ("B"), c) oricare dintre părțile heteroloage dezvoltate aici ("C") și, opțional, un linker ("X"). În astfel de cazuri, polipeptida de fuziune poate fi aranjată în modurile următoare (N-terminal la C-terminal): A-B-C sau C-B-A. În astfel de cazuri, polipeptida de fuziune poate fi aranjată în modurile următoare (N-terminal la C-terminal): X-A-B-C sau X-C-B-A. În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde fiecare dintre A, B și C (și opțional o secvență lider așa cum este secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 23) și cuprinde nu mai mult de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea).

În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23) amplasată în modul următor (N-terminal la C-terminal): X-A-B-C, și polipeptida de fuziune cuprinde 1, 2, 3, 4 sau 5 aminoacizi între X și A. În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23) amplasată în modul următor (N-terminal la C-terminal): X-C-B-A, și polipeptida de fuziune cuprinde 1, 2, 3, 4 sau 5 aminoacizi între X și C. În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23) amplasată în modul următor (N-terminal la C-terminal): X-A-B-C, și polipeptida de fuziune cuprinde o alanină între X și A. În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23) amplasată în modul următor (N-terminal la C-terminal): X-C-B-A, și polipeptida de fuziune cuprinde o alanină între X și C. În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23) amplasată în modul următor (N-terminal la C-terminal): X-A-B-C, și polipeptida de fuziune cuprinde o glicină și o alanină între X și A. În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23) amplasată în modul următor (N-terminal la C-terminal): X-C-B-A, și polipeptida de fuziune cuprinde o glicină și o alanină între X și C. În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23) amplasată în modul următor (N-terminal la C-terminal): X-A-B-C, și polipeptida de fuziune cuprinde o treonină între X și A. În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23) amplasată în modul următor (N-terminal la C-terminal): X-C-B-A, și polipeptida de fuziune cuprinde o treonină între X și C.

În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu oricare dintre secvențele de aminoacizi ale polipeptidei TβRII dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 18), în care partea de polipeptidă TβPII a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea). În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu oricare dintre secvențele de linker dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 6), în care partea de linker a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea). În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu oricare dintre secvențele părților heteroloage dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 20), în care partea heteroloagă a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea). În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi ale polipeptidei TβRII dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 18), în care partea de polipeptidă TβRII a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea). În unele cazuri, polipeptida de fuziune cuprinde oricare dintre secvențele de linker dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 6), în care partea de linker a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea). În unele cazuri,

polipeptida de fuziune cuprinde oricare dintre secvențele de parte heteroloagă dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 20), în care partea heteroloagă a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea).

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune, unde polipeptida de fuziune constă sau constă esențial din (și nu neapărat în ordinea următoare): a) o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu oricare dintre secvențele de aminoacizi ale polipeptidei TβRII dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 18), unde partea de polipeptidă TβRII a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); b) o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu oricare dintre secvențele de linker dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 6), în care partea linker a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); și c) o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu oricare dintre secvențele părții heteroloage dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 20), în care partea heteroloagă a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); și d) opțional o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23). În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune, unde polipeptida de fuziune constă sau constă esențial din (și nu neapărat în ordinea următoare): a) oricare dintre secvențele de aminoacizi ale polipeptidei TβRII dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 18), în care partea de polipeptidă TβRII a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); b) oricare dintre secvențele linkerului dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 6), în care partea linker a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); și c) oricare dintre secvențele părții heteroloage dezvoltate aici (de exemplu, SEQ ID NO: 20), în care partea heteroloagă a polipeptidei de fuziune cuprinde nu mai mult de 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); și d) opțional o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23).

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune care constă în sau care constă esențial din (și nu neapărat în ordinea următoare): a) o parte polipeptidă TβRII care constă într-o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18 și nu mai mult de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); b) o parte linker care constă într-o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 6 și nu mai mult de 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); și c) o parte heteroloagă care constă într-o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 95%, 97% sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20 și nu mai mult de 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); și d) opțional o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23). În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune care constă sau constă esențial din (și nu neapărat în ordinea următoare): a) o parte polipeptidă TβRII care constă în secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18 și nu mai mult de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); b) o parte linker care constă în secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 6 și nu mai mult de 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); și c) o parte heteroloagă care constă în secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20 și nu mai mult de 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 sau 1 aminoacizi suplimentari (dar care poate include modificări post-tranlaționale suplimentare, precum PEGilarea); și d) opțional o secvență lider (de exemplu, SEQ ID NO: 23).

În unele cazuri, proteina de fuziune nu cuprinde o secvență lider. În unele cazuri, proteina de fuziune cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 99% sau 100% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 48.

TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHLPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQK
 SCMSNCSTISICEKPKQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETF
 FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDTGGGSGGGGSGGGGSGGGGSTHTCPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 48).

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune cu TβRII în care polipeptida nu
 cuprinde un anticorp sau o parte a acestuia care leagă un antigen. În unele cazuri, polipeptida nu leagă cu
 5 afinitate considerabilă o citokină diferită de ligandul din superfamilia factorilor de creștere și transformare
 beta (de exemplu, TGFβ1, TGFβ2 și/sau TGFβ3). În unele cazuri, polipeptida nu leagă cu afinitate
 considerabilă o citokină diferită de TGFβ1, TGFβ2 și/sau TGFβ3. În unele cazuri, polipeptida nu leagă cu
 afinitate considerabilă o citokină diferită de TGFβ1 și/sau TGFβ3. În unele cazuri, polipeptida nu leagă cu
 10 afinitate considerabilă CD4, CD8, CD25, CTLA-4, IL-10, receptorul pentru TGFβ, PD-1, PD-L1, PD-L2,
 RANK, RANKL, HER2/neu, EGFR1, CD20, VEGF, TNF-α, TNFR2, FoxP3, CD80, CD86, IFN-α, IFN-
 β, IFN-γ, GITR, 4-1BB, OX-40, TLR1-10, ErbB-1, HER1, ErbB-3/HER3, ErbB-4/HER4, IGFR, IGFBP,
 IGF-1R, PDGFR, FGFR, VEGFR, HGFR, receptorul TRK, receptorii pentru adrenalină, receptorii AXL,
 receptorii LTK, receptorii TIE, angiopoietina 1, 2, receptorul ROR, receptorul DDR, receptorul RET,
 receptorul KLG, receptorul RYK, receptorul MuSK, ILβR, IlαR, TNTRSF, receptorul TRAIL, ARTC1,
 15 alfa-actinina-4, Bcr-abl, B-RAF, caspazele, beta-catenina, fibronectina, GPNMB, GDP-L, LDLR, HLA-
 A2, MLA-A11, HSP70, KIAA205, MART2, MUM-1, 2, 3, PAP, neo-PAP, NFYC, OGT, OS-9, proteina
 de fuziune pml-RARalfa, PRDX5, PTPRK, KRAS2, NRAS, HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPD1,
 proteina de fuziune SYT-SSX1 sau -SSX2, Triosefosfat Izomeraza, BAGE, BAGE-1, BAGE-2, 3, 4, 5,
 GAGE-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, GnT-V, HERV-K MEL, KK-LC, KM-HN-1, LAGE, LAGE-1, CAMEL,
 20 MAGE-1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-AS, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9,
 MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-3, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B5, MAGE-B6,
 MAGE-C1, MAGE-C2, mucina 1 (MUC1), MART-1/Melan-A (MLANA), gp100, gp100/Pmel17
 (SILV), tirozinaza (TYR), TRP-1, HAGE, NA-88, NY-ESO-1, NY-ESO-1/LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-
 1, 2, 3, 4, TRP2-1NT2, antigenul carcino-embrionic (CEA), Kallikrein 4, mammaglobin-A, OA1,
 25 antigenul specific pentru prostată (PSA), antigenul membranar specific pentru prostată, TRP-1/, 75. TRP-2,
 AIM-2, BING-4, CPSF, ciclina D1, Ep-CAM, EpaA3, FGF-5, gp250, iCE), AFP, M-CSF, mdm-2,
 MUC1, p53 (TP53), PBF, FRAME, PSMA, RAGE-1, RNF43, RU2AS, SOX10, STEAP1, survivina
 (BIRCS), hTERT, telomeraza, WT1, SYCP1, BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE-5, LIP1,
 CTAGE-1, CSAGE, MMA1, CAGE, BORIS, HOM-TES-85, AF15q14, HCA66I, LDHC, MORC, SGY-
 30 1, SPO11, TPX1, NY-SAR-35, FTHL17, NXF2 TDRD1, TEX 15, FATE, TPTE, receptorii pentru
 estrogen (ER), receptorii pentru androgen (AR), CD40, CD30, CD20, CD19, CD33, CD4, CD25, CD3,
 CA 72-4, CA 15-3, CA 27-29, CA 125, CA 19-9, gonadotropina corionică beta umană, 1-2
 microglobulina, antigenul carcinomului cu celule scuamoase, enolaza specifică pentru neuroni, proteina
 de șoc termic gp96, GM2, sargramostima, CTLA-4, 707-AP, ART-4, CAP-1, CLCA2, Cyp-B, HST-2,
 35 proteinele HPV, proteinele EBV, proteinele virusului Hepatitei B sau C și/sau proteinele HIV.

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune cu TβRII în care polipeptida nu
 cuprinde un domeniu de legare a ligandului suplimentar față de domeniul TβRII. În unele cazuri,
 polipeptida cuprinde o secvență liniară de aminoacizi care cuprinde un domeniu TβRII și o parte
 heteroloagă (de exemplu, o parte Fc), dar secvența liniară de aminoacizi nu cuprinde niciun domeniu
 40 suplimentar de legare la liganzi. În unele cazuri, polipeptida cuprinde o secvență liniară de aminoacizi
 care cuprinde un domeniu TβRII și o parte Fc, dar secvența liniară de aminoacizi nu cuprinde niciun
 domeniu suplimentar de legare la liganzi. În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune
 cu TβRII în care polipeptida nu cuprinde mai multe domenii de legare a liganzilor într-o singură secvență
 liniară de aminoacizi. În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune cu TβRII în care
 45 polipeptida nu cuprinde mai mult de o secvență linker continuă, într-o singură secvență liniară de
 aminoacizi. În unele cazuri, polipeptida nu cuprinde mai mulți linkeri de glicină și/sau serină continui (de
 exemplu, un linker care cuprinde (GGGGS)_n, unde $n \geq 4$) într-o singură secvență liniară de aminoacizi.
 În unele cazuri, dezvoltarea furnizează o polipeptidă de fuziune cu TβRII în care partea heteroloagă este
 un domeniu Fc și în care este legat covalent la domeniul Fc doar un linker continuu. În unele cazuri,
 50 linkerul continuu unic cuprinde sau constă într-un linker (GGGGS)_n, unde $n \geq 4$.

6. Acizi nucleici și metode de producere

În unele cazuri, dezvoltarea de față face disponibile forme de proteine de fuziune cu polipeptide
 TβRII izolate și/sau purificate, care sunt izolate din, sau alternativ substanțial lipsite de (de exemplu,
 55 lipsite în măsură de cel puțin 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99%) alte proteine și/sau alte specii de

polipeptide T β R β II. Polipeptidele T β R β II vor fi în general produse prin exprimarea din acizi nucleici recombinanți.

În unele cazuri, dezvoltarea include acizi nucleici care codifică polipeptidele T β R β II solubile care cuprind secvența care codifică o parte extracelulară a unei proteine T β R β II. În cazuri suplimentare, această dezvoltare se referă de asemenea la o celulă gazdă care cuprinde astfel de acizi nucleici. Celula gazdă poate fi o celulă procariotă sau eucariotă. De exemplu, o polipeptidă conform dezvoltării de față poate fi exprimată în celule bacteriene așa cum sunt *E. coli*, în celule de insecte (de exemplu, utilizând un sistem de exprimare cu baculovirus), drojdie, sau celule mamifere. Alte celule gazdă adecvate sunt cunoscute specialistului în domeniu. În conformitate, unele cazuri ale dezvoltării de față se referă suplimentar la metode de producere a polipeptidelor T β R β II.

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează acizi nucleici izolați și/sau recombinanți care codifică oricare dintre polipeptidele T β R β II, incluzând fragmente, variante funcționale și proteine de fuziune dezvoltate aici. SEQ ID NO: 10, 12 și 14 codifică variante ale domeniului extracelular al T β R β II fuzionat la un domeniu Fc de IgG. Acizii nucleici subiect pot fi monocatenari sau dublucatenari. Astfel de acizi nucleici pot fi molecule de ADN sau ARN. Acești acizi nucleici pot fi utilizați, de exemplu, în metode de producere a polipeptidelor T β R β II sau ca agenți terapeutici direcți (de exemplu, într-o abordare de terapie cu antisens, ARNi sau genică).

În unele cazuri, acizii nucleici subiect care codifică polipeptidele T β R β II sunt înțeleși suplimentar a include acizi nucleici care sunt variante ale SEQ ID NO: 10, 12 și 14. Variante de secvențe de nucleotide includ secvențe care diferă prin una sau mai multe substituții, adiiții sau deleții de nucleotide, așa cum sunt variantele alelice.

În unele cazuri, dezvoltarea furnizează secvențe de acizi nucleici izolate sau recombinante care sunt identice cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% cu SEQ ID NO: 10, 12 și 14. În cazuri particulare, dezvoltarea furnizează secvențe de acizi nucleici izolate sau recombinante care sunt identice cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% cu SEQ ID NO: 12, sau fragmente ale acestora. Specialistul în domeniu va aprecia că secvențele de acizi nucleici complementare cu SEQ ID NO: 10, 12 și 14 și cu variantele ale SEQ ID NO: 10, 12 și 14 sunt de asemenea în întinderea acestei dezvoltări. În cazuri suplimentare, secvențele de acizi nucleici conform dezvoltării pot fi izolate, recombinante și/sau fuzionate cu o secvență de nucleotide heterologă sau într-o bibliotecă de ADN.

În alte cazuri, acizii nucleici conform dezvoltării includ de asemenea secvențe de nucleotide care hibridizează în condiții foarte stricte cu secvențele de nucleotide indicate în SEQ ID NO: 10, 12 și 14, secvențele complementare ale SEQ ID NO: 10, 12 și 14 sau cu fragmente ale acestora. Așa cum este discutat mai sus, specialistul în domeniu va înțelege ușor că pot fi variate condițiile adecvate de strictețe care promovează hibridizarea ADN. De exemplu, hibridizarea poate fi făcută la 6,0 x clorură de sodiu/citrat de sodiu (SSC) la aproximativ 45°C, urmată de o spălare cu 2,0 x SSC la 50°C. De exemplu, concentrația de sare din etapa de spălare poate fi selectată de la o strictețe mică de aproximativ 2,0 x SSC la 50°C la o strictețe înaltă de aproximativ 0,2 x SSC la 50°C. În plus, temperatura din etapa de spălare poate fi crescută de la condiții cu strictețe mică, la temperatura camerei, de aproximativ 22°C, la condiții cu strictețe înaltă la aproximativ 65°C. Pot fi variate atât temperatura cât și concentrația de sare sau temperatura sau concentrația de sare pot fi menținute constante în timp ce este modificată cealaltă variabilă. În unele cazuri, dezvoltarea furnizează acizi nucleici care hibridizează în condiții de strictețe joasă de 6 x SSC la temperatura camerei urmată de o spălare la 2 x SSC la temperatura camerei.

Acizii nucleici izolați care diferă de acizii nucleici așa cum sunt expuși în SEQ ID NO: 10, 12 și 14 din cauza degenerescenței codului genetic sunt de asemenea în întinderea conform dezvoltării. De exemplu, un număr de aminoacizi sunt codificați de mai mult de un triplet. Codonii care specifică același aminoacid, sau sinonime (de exemplu, CAU și CAC sunt sinonime pentru histidine), pot duce la mutații " silențioase " care nu afectează secvența de aminoacizi a proteinei. Totuși, este de așteptat ca între celulele mamifere să existe polimorfisme ale secvenței de ADN care nu conduc la modificări ale secvențelor de aminoacizi ale proteinelor subiect. Specialistul în domeniu va aprecia că între indivizi ai unei anumite specii pot exista astfel de variații în una sau mai multe nucleotide (până la aproximativ 3-5% dintre nucleotide) ale acizilor nucleici care codifică o anumită proteină din cauza variației alelice naturale. Sunt în întinderea acestei dezvoltări oricare și toate astfel de variații ale nucleotidelor și polimorfismele aminoacizilor rezultate.

Specialistul în domeniu va aprecia variante corespondente bazate pe izoforma lungă a T β R β II vor include secvențe de nucleotide care codifică insertul de 25 de aminoacizi, împreună cu o substituție conservativă Val-Ile în poziția de flancare C-terminală față de insert. Va fi de asemenea apreciat că variantele corespondente bazate pe oricare dintre izoforma lungă (A) sau scurtă (B) a T β R β II vor include secvențe de nucleotide variate care cuprind un insert de 108 nucleotide, care codifică un insert de 36 de

aminoacizi (SEQ ID NO: 41), la aceeași localizare descrisă pentru izoforma C a T β RII cu ocurență naturală.

În unele cazuri, acizii nucleici recombinanți conform dezvoltării pot fi legați operabil la una sau mai multe secvențe de nucleotide reglatoare dintr-un construct de exprimare. Secvențele de nucleotide reglatoare vor fi în general adecvate pentru celula gazdă utilizată pentru exprimare. Sunt cunoscute în domeniu numeroase tipuri de vectori de exprimare adecvați și secvențe reglatoare adecvate pentru o diversitate de celule gazdă. Caracteristic, acele una sau mai multe secvențe de nucleotide reglatoare menționate pot include, dar nu sunt limitate la, secvențe promotor, secvențe lider sau semnal, situsuri de legare ribozomală, secvențe de începere și terminare a transcripției, secvențe de începere și terminare a translației și secvențe augmentator sau activator. Dezvoltarea consideră promotori constitutivi sau inductibili, așa cum sunt cunoscuți în domeniu. Promotorii pot fi fie promotori cu ocurență naturală sau promotori hibridi care combină elemente de la mai mult de un promotor. Un construct de exprimare poate fi prezent într-o celulă într-un epizom, așa cum este un plasmid sau constructul de exprimare poate fi inserat într-un cromozom. Într-un caz preferat, vectorul de exprimare conține o genă marker selectabil pentru a permite selecția celulelor gazdă transformate. Genele marker selectabil sunt bine cunoscute în domeniu și vor varia în funcție de celula gazdă utilizată.

În unele cazuri dezvoltate aici, acidul nucleic subiect este furnizat într-un vector de exprimare care cuprinde o secvență de nucleotide care codifică o polipeptidă T β RII și este legat operabil la cel puțin o secvență reglatoare. Secvențele reglatoare sunt recunoscute în domeniu și sunt selectate pentru a conduce exprimarea polipeptidei T β RII. În conformitate, termenul secvență reglatoare include promotori, augmentatori și alte elemente de control al exprimării. Secvențe reglatoare exemplificatoare sunt descrise în Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). De exemplu, pentru a exprima secvențele ADN care codifică o polipeptidă T β RII din acești vectori poate fi utilizată oricare dintr-o mare diversitate de secvențe de control al exprimării care controlează exprimarea unei secvențe de ADN, atunci când sunt legate operativ la aceasta. Astfel de secvențe de control al exprimării utile, includ, de exemplu, promotorii precoce și tardiv ai SV40, promotorul tet, promotorul precoce imediat de la citomegalovirus sau adenovirus, promotori RSV, sistemul lac, sistemul trp, sistemul TAC sau TRC, promotorul T7 a cărui exprimare este condusă de ARN polimeraza T7, regiunile operator major și promotor ale fagului lambda, regiunile de control pentru proteina fd din înveliș, promotorul 3-fosfoglicerat kinazei sau altor enzime glicolitice, promotorii fosfatazei acide, de exemplu, Pho5, promotorii factorilor α de împerechere de la drojdie, promotorul polihedron al sistemului baculovirusului și alte secvențe cunoscute a controla exprimarea genelor celulelor procariote sau eucariote sau a virusurilor acestora și diferite combinații ale acestora. Ar trebui să fie înțeles că proiectarea vectorului de exprimare poate depinde de factori așa cum sunt alegerea celulei gazdă care va fi transformată și/sau tipul de proteină care este dorit a fi exprimat. Mai mult, ar trebui luate de asemenea în considerare numărul de copii al vectorului, capacitatea de controlare a celui număr de copii și a exprimării oricărei alte proteine codificate de vector, așa cum sunt markeri pentru antibiotic.

Un acid nucleic recombinant inclus în dezvoltare poate fi produs prin legarea unei gene clonate, sau unei părți a acesteia, într-un vector adecvat pentru exprimarea fie în celule procariote, fie în celule eucariote (drojdii, aviene, de insecte sau mamifere) sau amândouă. Vehicule de exprimare pentru producerea unei polipeptide T β RII recombinante includ plasmide și alți vectori. De exemplu, vectori adecvați includ plasmide de tipul: plasmide derivate din pBR322, plasmide derivate din pEMBL, plasmide derivate din pEX, plasmide derivate din pBTac și plasmide derivate din pUC pentru exprimarea în celule procariote, așa cum sunt *E. coli*.

Unii vectori de exprimare mamiferă conțin atât secvențe procariote pentru a favoriza propagarea vectorului în bacterii, cât și una sau mai multe unități de transcripție eucariote care sunt exprimate în celule eucariote. Vectorii derivați din pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo și pHyg sunt exemple de vectori de exprimare la mamifere care sunt adecvați pentru transfecția celulelor eucariote. Unii dintre acești vectori sunt modificați cu secvențe din plasmide bacteriene, așa cum este pBR322, pentru a favoriza replicarea și selecția prin rezistența la medicamente atât în celulele procariote cât și eucariote. Alternativ, pentru exprimarea tranzientă a proteinelor în celule eucariote pot fi utilizați derivați din virusuri așa cum sunt virusul papilloma bovin (BPV-1), sau virusul Epstein-Barr (pHEBo, derivat din pREP și p205). Mai jos, pot fi găsite exemple de alte sisteme de exprimare virale (incluzând retrovirale), în descrierea sistemelor de furnizare a terapiei genice. Diferitele metode utilizate în prepararea plasmidelor și în transformarea organismelor gazdă sunt bine cunoscute în domeniu. Pentru alte sisteme de exprimare adecvate, atât pentru celulele procariote cât și eucariote, cât și proceduri generale de recombinare, vezi Molecular Cloning A Laboratory Manual, Ed. A 3-a, ed. de Sambrook, Fritsch și Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). În unele cazuri, poate fi de dorit exprimarea polipeptidelor recombinante prin

utilizarea unui sistem de exprimare cu baculovirus. Exemplee de astfel de sisteme de exprimare cu baculovirus includ vectorii derivați din pVL (așa cum sunt pVL1392, pVL1393 și pVL941), Vectorii derivați din pAcUW (așa cum este pAcUW1) și vectorii derivați din pBlueBac (așa cum este pBlueBac III care conține β -gal).

În unele cazuri, va fi proiectat un vector pentru producerea polipeptidelor T β R β II subiect în celule CHO, așa cum este un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectori pcDN4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) și vectori pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Într-un caz preferat, va fi proiectat un vector pentru producerea polipeptidelor T β R β II subiect în celule HEK-293. Așa cum va fi evident, construcții genice subiect pot fi utilizați pentru a duce la exprimarea polipeptidelor T β R β II subiect în celule propagate în cultură, de exemplu, pentru a produce pentru purificare proteine, incluzând proteine de fuziune sau variante ale proteinelor.

Această dezvăluire se referă de asemenea la o celulă gazdă transfectată cu o genă recombinantă care include o secvență codificantă (de exemplu, SEQ ID NO: 10, 12 sau 14) pentru una sau mai multe dintre polipeptidele T β R β II subiect. Celula gazdă poate fi orice celulă procariotă sau eucariotă. De exemplu, o polipeptidă T β R β II dezvăluită aici poate fi exprimată în celule bacteriene așa cum sunt *E. coli*, celule de insecte (de exemplu, utilizând un sistem de exprimare cu baculovirus), drojdie, sau celule mamifere. Specialistului în domeniu îi sunt cunoscute și alte celule gazdă adecvate.

În conformitate, dezvăluirea de față se referă suplimentar la metode de producere a polipeptidelor T β R β II subiect. De exemplu, o celulă gazdă transfectată cu un vector de exprimare care codifică o polipeptidă T β R β II poate fi cultivată în condiții adecvate pentru a permite să aibă loc exprimarea polipeptidei T β R β II. Polipeptida T β R β II poate fi secretată și izolată dintr-un amestec de celule și mediu care conțin polipeptida T β R β II. Alternativ, polipeptida T β R β II poate fi reținută în citoplasmă sau într-o fracție membranară și celulele să fie recoltate, lizate și izolată proteina. O cultură celulară include celule gazdă și mediu. Medii adecvate pentru cultura celulară sunt bine cunoscute în domeniu. Polipeptidele T β R β II subiect pot fi izolate din mediul de cultură, celule gazdă, sau ambele, utilizând tehnici de purificare a proteinelor cunoscute în domeniu, incluzând cromatografia cu schimb ionic, cromatografia de filtrare în gel, ultrafiltrarea, electroforeza, purificarea prin imunoafinitate cu anticorpi specifici pentru anumiți epitopi ai polipeptidelor T β R β II și purificarea prin afinitate cu un agent care leagă un domeniu fuzionat la polipeptida T β R β II (de exemplu, pentru a purifica o fuziune T β R β II-Fc poate fi utilizată o coloană de proteină A). Într-un caz preferat, polipeptida T β R β II este o proteină de fuziune care conține un domeniu care înlesnește purificarea acesteia. De exemplu, purificarea poate fi făcută printr-o serie de etape de cromatografie în coloană, incluzând, de exemplu, trei sau mai multe dintre următoarele, în orice ordine: cromatografie cu proteina A, cromatografie cu sefaroza Q, cromatografie cu fenilsefaroză, cromatografie cu excludere prin dimensiune și cromatografie cu schimb cationic. Purificarea ar putea fi finalizată cu filtrarea virală și schimbarea tamponului.

Într-un alt caz, o genă de fuziune care codifică o secvență lider pentru purificare, așa cum este o secvență poli-(His)/situs de scindare pentru enterokinază la capătul N-terminal al părții dorite a polipeptidei T β R β II recombinante, poate permite purificarea proteinei de fuziune exprimate prin cromatografie de afinitate utilizând o rășină cu metal Ni²⁺. Secvența lider de purificare poate fi apoi îndepărtată prin tratamentul cu enterokinaze, pentru a se furniza polipeptida T β R β II purificată (de exemplu, vezi Hochuli și colab., (1987) J. Chromatography 411:177; și Janknecht și colab., PNAS USA 88:8972).

Tehnici de producere a genelor de fuziune sunt bine cunoscute. În esență, unirea diferitelor fragmente de ADN care codifică diferite secvențe de polipeptide este realizată în conformitate cu tehnici convenționale, care utilizează pentru legare capete boante sau decalate, digestia cu enzime de restricție pentru a furniza capetele adecvate, umplerea capetelor coezive după cum este adecvat, tratamentul cu fosfatază alcalină pentru a se preveni unirea nedorită și legarea enzimatică. Într-un alt caz, gena de fuziune poate fi sintetizată prin tehnici convenționale care includ sintetizatori automați de ADN. Alternativ, poate fi realizată amplificarea PCR a fragmentelor de gene cu utilizarea primerilor ancoră care dau naștere la prelungiri complementare între două fragmente genice consecutive care pot fi ulterior unite pentru a se genera o secvență genică himerică (vezi, de exemplu, Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel și colab., John Wiley & Sons: 1992).

7. Modificări ale proteinelor de fuziune cu Fc

Cererea dezvăluiește suplimentar proteine de fuziune T β R β II-Fc cu regiuni Fc proiectate sau variante. Astfel de anticorpi și proteine de fuziune cu Fc pot fi utile, de exemplu, pentru modularea funcțiilor de efector, așa cum sunt, citotoxicitatea dependentă de antigen (ADCC) și citotoxicitatea dependentă de complement (CDC). Suplimentar, modificările pot îmbunătăți stabilitatea anticorpilor și

proteinelor de fuziune cu Fc. Variantele de secvențe de aminoacizi ale anticorpilor și proteinelor de fuziune cu Fc sunt preparate prin introducerea în ADN a modificărilor nucleotidelor adecvate sau prin sinteză peptidică. Astfel de variante includ, de exemplu, deleții din și/sau inserții în și/sau substituții ale resturilor din secvențele de aminoacizi ale anticorpilor și proteinelor de fuziune cu Fc dezvăluite aici.

Pentru a se ajunge la constructul final este făcută orice combinație de deleție, inserție și substituție, cu condiția ca constructul final să aibă caracteristicile dorite. Modificările aminoacizilor pot modifica de asemenea procesele post-tranlaționale ale anticorpilor și proteinelor de fuziune cu Fc, așa cum este schimbarea numărului sau poziției situsurilor de glicozilare.

Pot fi produse anticorpi și proteine de fuziune cu Fc cu funcție redusă de efector prin introducerea modificărilor în secvența de aminoacizi, incluzând, dar ne limitate la, mutația Ala-Ala descrisă de Bluestone și colab. (vezi WO 94/28027 și WO 98/47531; vezi de asemenea Xu și colab. 2000 Cell Immunol 200; 16-26). Astfel, în unele cazuri, pot fi utilizate proteinele de fuziune cu Fc conform dezvăluirii cu mutații în regiunea constantă, care includ mutația Ala-Ala, pentru a se reduce sau aboli funcția de efector. Conform acestor cazuri, anticorpii și proteinele de fuziune cu Fc pot cuprinde o mutație către o alanină în poziția 234 sau o mutație către o alanină în poziția 235, sau o combinație a acestora. Într-un caz, anticorpul sau proteina de fuziune cu Fc cuprinde un cadru de IgG4, în care mutația Ala-Ala ar descrie o mutație (sau mutații) de la fenilalanină la alanină în poziția 234 și/sau o mutație de la leucină la alanină în poziția 235. Într-un alt caz, anticorpul sau proteina de fuziune cu Fc cuprinde un cadru de IgG1, în care mutația Ala-Ala ar descrie o mutație (sau mutații) de la leucină la alanină în poziția 234 și/sau o mutație de la leucină la alanină în poziția 235. Anticorpul sau proteina de fuziune cu Fc poate alternativ sau suplimentar să poarte alte mutații, incluzând mutația punctiformă K322A din domeniul CH2 (Hezareh și colab. 2001 J Virol. 75: 12161-8).

În cazuri particulare, anticorpul sau proteina de fuziune cu Fc poate fi modificat fie pentru a se crește fie pentru a se inhiba citotoxicitatea dependentă de complement (CDC). Modularea activității CDC poate fi realizată prin introducerea într-o regiune Fc a uneia sau mai multor substituții, inserții sau deleții de aminoacizi (vezi, de exemplu, Brevetul U.S. Nr. 6.194.551). Alternativ sau suplimentar, în regiunea Fc pot fi introduse resturi de cisteină, permițând prin urmare formarea în această regiune a legăturilor disulfurice dintre lanțuri. Anticorpul homomeric generat astfel poate avea o capacitate de internalizare îmbunătățită sau redusă și/sau omorâre celulară mediată de complement crescută sau scăzută. Vezi Caron și colab., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) și Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992), WO99/51642, Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); Brevetul U.S. Nr. 5.648.260; Brevetul U.S. Nr. 5.624.821; și WO94/29351.

8. Analize de screening

În unele cazuri, dezvăluirea de față se referă la utilizarea polipeptidelor TβRII (de exemplu, polipeptidele TβRII solubile) pentru a identifica compuși (agenți) care sunt agoniști sau antagoniști ai căii de semnalizare prin TGFβ1, TGFβ3 și TβRII. Compușii identificați prin acest screening pot fi testați pentru a li se evalua capacitatea de a modula activitatea de semnalizare prin TGFβ1 și TGFβ3 in vitro. Opțional, acești compuși pot fi testați suplimentar în modele animale pentru a li se evalua capacitatea de a modula creșterea tisulară in vivo.

Există o mulțime de abordări pentru screeningul agenților terapeutici pentru modularea creșterii tisulare prin țintirea TGFβ1, TGFβ3 și polipeptidelor TβRII. În unele cazuri, poate fi realizat screeningul în volum mare al compușilor pentru a identifica agenți care interferează cu semnalizarea celulară mediată de TGFβ1, TGFβ3 sau TβRII. În unele cazuri, analiza este realizată pentru screeningul și identificarea compușilor care inhibă specific sau reduc legarea unei polipeptide TβRII la TGFβ1 sau TGFβ3. Alternativ, analiza poate fi utilizată pentru a identifica compuși care cresc legarea unei polipeptide TβRII la TGFβ1 sau TGFβ3. Într-un caz suplimentar, compușii pot fi identificați pe baza capacității lor de a interacționa cu TGFβ1, TGFβ3 sau o polipeptidă TβRII.

Vor fi suficiente o diversitate de formate de analiză și, din prisma dezvăluirii de față, specialistul în domeniu le va înțelege și pe cele care nu sunt descrise specific aici. Așa cum este descris aici, compușii (agenții) de testat pot fi creați prin orice metodă chimică combinatorială. Alternativ, compușii subiecți pot fi biomolecule cu ocurență naturală sintetizate in vivo sau in vitro. Compușii (agenții) de testat pentru capacitatea lor de a acționa ca modulatori ai creșterii tisulare pot fi produși, de exemplu, în bacterii, drojdii, plante sau alte organisme (de exemplu, produși naturali), produși chimic (de exemplu, molecule mici, incluzând peptidomimetice) sau produși recombinant. Compușii de testat considerați aici includ molecule organice ne-peptidice, peptide, polipeptide, peptidomimetice, zaharuri, hormoni și molecule de acid nucleic. Într-un caz particular, agentul de testat este o moleculă organică mică care are o greutate moleculară mai mică de aproximativ 2.000 de daltoni.

Compușii de testat descriși aici pot fi furnizați ca entități individuale, discrete, sau pot fi furnizați în biblioteci cu complexitate mai mare, așa cum sunt produse prin chimia combinatorială. Aceste biblioteci pot cuprinde, de exemplu, alcooli, alchil halide, amine, amide, esteri, aldehide, eteri și alte clase de compuși organici. Prezentarea compușilor de testat unui sistem de testare poate fi făcută fie în formă izolată, fie ca amestecuri de compuși, mai ales în etapele inițiale de screening. Opțional, compușii pot fi derivatizați opțional cu alți compuși și să aibă grupări de derivatizare care înlesnesc izolarea compușilor. Exemple nelimitante de grupări de derivatizare includ biotina, fluoresceina, digoxigenina, proteina fluorescentă în verde, izotopi, polihistidina, microsfele magnetice, glutathion S transferaza (GST), reticulatori fotoactivabili sau orice combinație a acestora.

În multe programe de screening al medicamentelor care testează biblioteci de compuși și extracți naturali, sunt de dorit analize cu volum mare în scopul maximizării numărului de compuși evaluați în intervalul de timp. Sunt deseori preferate ca analize "primare" de screening analizele care sunt realizate în sisteme lipsite de celule, așa cum pot fi derivate din proteine purificate sau semi-purificate, deoarece acestea pot fi generate pentru a se permite dezvoltarea rapidă și detectarea relativ ușoară a unei modificări a unei ținte moleculare care este mediată de un compus de testat. Mai mult, efectele toxicității celulare sau biodisponibilității compusului de testat pot fi în general ignorate în sistemul in vitro, analiza fiind în schimb concentrată în principal pe efectul medicamentului asupra țintei moleculare, așa cum se poate manifesta printr-o modificare a afinității de legare între o polipeptidă TβRII și TGFβ1 sau TGFβ3.

Doar în scop ilustrativ, într-o analiză exemplificatoare de screening descrisă aici, compusul de interes este pus în contact cu o polipeptidă TβRII izolată și purificată care este de obicei capabilă să lege TGFβ1 sau TGFβ3. Amestecului de compus și polipeptidă TβRII îi este apoi adăugată o compoziție care conține un ligand al TβRII. Detecția și cuantificarea complexelor TβRII/TGFβ1 sau TβRII/TGFβ3 furnizează o metodă de determinare a eficienței compusului de a inhiba (sau potența) formarea de complexe între polipeptida TβRII și TGFβ1 sau TGFβ3. Eficiența compusului poate fi evaluată prin generarea din datele obținute a curbelor doză-răspuns, utilizând diferite concentrații de compus de testat. Mai mult, poate fi realizată de asemenea o analiză martor pentru a se furniza un nivel bazal în scopul comparării. De exemplu, într-o analiză martor, este adăugat TGFβ1 sau TGFβ3 izolat și purificat unei compoziții care conține polipeptida TβRII și este cuantificată formarea de complexe TβRII/TGFβ1 sau TβRII/TGFβ3 în absența compusului de testat. Se va înțelege că, în general, ordinea în care pot fi amestecați reactivii poate fi variată și aceștia pot fi amestecați simultan. Mai mult, în locul proteinelor purificate pot fi utilizați extracți și lizați celulari pentru a se produce un sistem adecvat lipsit de celule.

Formarea complexelor între polipeptida TβRII și TGFβ1 sau TGFβ3 poate fi detectată printr-o diversitate de tehnici. De exemplu, modularea formării complexelor poate fi cuantificată utilizând, de exemplu, proteine marcate detectabil, așa cum sunt polipeptide TβRII sau TGFβ1 sau TGFβ3 marcate radioactiv (de exemplu, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C sau ³H), marcate fluorescent (de exemplu, FITC) sau marcate enzimatic, prin imunoanalize sau prin detectare cromatografică.

Aici este descrisă de asemenea utilizarea analizelor de polarizare a fluorescenței și analizele de fluorescență cu transfer energetic prin rezonanță (FRET) pentru măsurarea, direct sau indirect, a gradului de interacțiune între o polipeptidă TβRII și proteina sa de legare. Suplimentar, cu multe cazuri descrise aici sunt compatibile și alte moduri de detecție, așa cum sunt cele bazate pe ghiduri de undă optice (Publicația PCT WO 96/26432 și Brevetul U.S. Nr. 5.677.196), rezonanța plasmonilor de suprafață (SPR), senzori ai sarcinilor suprafeței și senzori ai forțelor de suprafață.

Mai mult, aici este descrisă de asemenea utilizarea unei analize cu capcană de interacțiune, cunoscută și ca "analiza cu doi hibrizi", pentru identificarea agenților care întrerup sau potențează interacțiunea dintre o polipeptidă TβRII și proteina sa de legare. Vezi de exemplu, Brevetul U.S. Nr. 5.283.317; Zervos și colab. (1993) Cell 72:223-232; Madura și colab. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel și colab. (1993) Biotechniques 14:920-924; și Iwabuchi și colab. (1993) Oncogene 8:1693-1696). Aici este descrisă suplimentar utilizarea sistemelor cu doi hibrizi inverse pentru a se identifica compuși (de exemplu, molecule mici sau peptide) care disociază interacțiunile dintre o polipeptidă TβRII și proteina sa de legare. Vezi de exemplu, Vidal și Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal și Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; și Brevetele U.S. Nr. 5.525.490; 5.955.280; și 5.965.368.

În unele cazuri, compușii subiecți sunt identificați pe baza capacității lor de a interacționa cu o polipeptidă TβRII sau TGFβ1 sau TGFβ3 descrisă aici. Interacțiunea dintre compus și polipeptida TβRII sau TGFβ1 sau TGFβ3 poate fi covalentă sau necovalentă. De exemplu, o astfel de interacțiune poate fi identificată la nivel de proteină utilizând metode biochimice in vitro, incluzând foto-reticularea, legarea liganzilor marcați radioactiv și cromatografia de afinitate (Jakoby WB și colab., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). În anumite cazuri, compușii pot fi evaluați prin screeningul într-o analiză bazată pe mecanism, așa cum este o analiză pentru detectarea compușilor care leagă o polipeptidă TGFβ1 sau TGFβ3 sau TβRII. Aceasta poate include un eveniment de legare în fază solidă sau în fază lichidă.

Alternativ, gena care codifică o polipeptidă TGFβ1 sau TGFβ3 sau TβRII poate fi transfectată într-o celulă cu un sistem reporter (de exemplu, β-galactozidaza, luciferaza sau proteina fluorescentă în verde) și analizată prin screening împotriva bibliotecii, preferabil prin screeningul în volum mare, sau cu membri individuali ai bibliotecii. Pot fi utilizate și alte analize ale legării bazate pe mecanism, de exemplu, analize ale legării care detectează modificări ale energiei libere. Analizele de legare pot fi realizate cu ținta fixată la un godeu, microsferă sau cip sau capturată de un anticorp imobilizat sau rezolvată prin electroforeză capilară. Compușii legați pot fi detectați de obicei utilizând analize colorimetrice sau de fluorescență sau rezonanța plasmonilor de suprafață.

Aici sunt descrise de asemenea metode și agenți pentru modularea (stimularea sau inhibarea) semnalizării celulare mediate prin TGFβ1 sau TGFβ3. Prin urmare, orice compus identificat poate fi testat în celule întregi sau țesuturi, in vitro sau in vivo, pentru a se confirma capacitatea acestuia de a modula semnalizarea prin TGFβ1 sau TGFβ3. În acest scop pot fi utilizate diferite metode cunoscute în domeniu.

9. Utilizări terapeutice exemplificatoare

Așa cum este utilizat aici, un agent terapeutic care "previne" o boală sau stare se referă la un compus care, într-un eșantion statistic, reduce apariția afecțiunii sau stării în eșantionul tratat comparativ cu într-un eșantion martor netratat sau întârzie debutul sau reduce severitatea unuia sau mai multor simptome ale afecțiunii sau stării comparativ cu eșantionul martor netratat.

Termenii "tratament", "care tratează", "ameliorare" și asemănători sunt utilizați aici pentru a însemna în general obținerea unui efect farmacologic și/sau fiziologic dorit, și pot fi utilizați de asemenea pentru a se referi la îmbunătățirea, ameliorarea, și/sau scăderea severității unuia sau mai multor simptome ale unei stări care este tratate. Efectul poate fi profilactic prin prisma întârzierii complete sau parțiale a apariției sau recidivei unei boli, stări sau a simptomelor acestora și/sau poate fi terapeutic prin prisma unei vindecări parțiale sau complete a unei boli sau stări și/sau a efectelor adverse atribuite bolii sau stării. Așa cum este utilizat aici, "tratament" acoperă orice tratament al unei boli sau stări a unui mamifer, în special a unui om, și include: (a) prevenirea apariției bolii sau stării la un subiect care poate fi predispus la boală sau stare dar nu a fost încă diagnosticat cu aceasta; (b) inhibarea bolii sau stării (de exemplu, oprirea dezvoltării acesteia); sau (c) ameliorarea bolii sau stării (de exemplu, ducerea la remisia bolii sau stării, furnizarea îmbunătățirii unuia sau mai multor simptome).

Termenii "pacient", "subiect" sau "individ" sunt utilizate aici interschimbabil și se referă fie la un om fie la un animal neuman. Acești termeni includ mamifere, așa cum sunt oameni, primate neumane, animale de laborator, animale pentru agricultură (incluzând bovine, porcine, cămile, etc.), animale de companie (de exemplu, canine, feline, alte animale domestice, etc.) și rozătoare (de exemplu, șoareci și șobolani). Pacientul, subiectul sau individul poate fi un om.

Aici sunt descrise de asemenea metode de tratament sau prevenire a unei boli sau stări asociate cu un membru al superfamiliei TGFβ, prin administrarea către subiect a unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă TβRII, incluzând o proteină de fuziune TβRII-Fc de mai sus, denumite în continuare colectiv "agenți terapeutici". În unele cazuri boala sau starea este asociată cu semnalizare prin TGFβ1 sau TGFβ3 dereglată. Aici sunt descrise de asemenea metode și compoziții pentru tratamentul anumitor afecțiuni cardiovasculare sau vasculare. În plus, aici sunt descrise de asemenea metode și compoziții pentru tratamentul sau prevenirea cancerului. În plus, aici sunt descrise de asemenea metode și compoziții pentru tratamentul sau prevenirea afecțiunilor și stărilor fibrotice.

În special, agenții terapeutici polipeptidici din dezvoltarea de față sunt utili pentru tratamentul sau prevenirea bolilor vasculare sau cardiovasculare cronice. Boli exemplificatoare de acest tip includ, dar nu sunt limitate la, boli cardiace (incluzând boală miocardică, infarct miocardic, angină pectorală și boli ale valvelor cardiace); boli renale (incluzând inflamația glomerulară cronică, insuficiență renală diabetică, și inflamație renală asociată lupusului); afecțiuni asociate aterosclerozei sau altor tipuri de arterioscleroză (incluzând accident cerebral, hemoragie cerebrală, hemoragie subarahnoidă, angină pectorală și arterioscleroză renală); afecțiuni trombotice (incluzând tromboză cerebrală, necroză intestinală trombotică); complicații ale diabetului (incluzând retinopatie asociată diabetului, cataracte, nefropatie asociată diabetului, neuropatologie asociată diabetului, gangrenă asociată diabetului și infecție cronică asociată diabetului); afecțiuni vasculare inflamatoare (lupus eritematos sistemic, reumatism articular, inflamație arterială a articulațiilor, inflamație arterială cu celule mari, Boala Kawasaki, arterita Takayasu, sindrom Churg-Strauss, și purpură Henoch-Schoenlein); vasculopatii diabetice; și afecțiuni cardiace așa cum sunt boală cardiacă congenitală, cardiomiopatie (de exemplu, cardiomiopatie dilatativă, hipertrofică, restrictivă) și insuficiență cardiacă congestivă. Afecțiuni exemplificatoare includ suplimentar, dar nu sunt limitate la, telangiectazia hemoragică hereditară (HHT), sindrom Marfan, sindrom Loeys-Dietz,

sindromul anevrismului aortei toracice familial, sindrom de tortuozitate arterială, pre-eclampsie și restenozare.

Polipeptida TβRII poate fi administrată subiectului singură sau în combinație cu unul sau mai mulți agenți sau moduri terapeutice, de exemplu, agenți terapeutici, care sunt utili pentru tratamentul afecțiunilor și/sau stărilor cardiovasculare asociate cu TGFβ. În unele cazuri, al doilea agent sau mod

terapeutic este ales dintre una sau mai multe din: angioplastie, beta blocați, anti-hipertensive, cardiotonice, anti-trombotice, vasodilatatori, antagoniști de hormoni, antagoniști de endotelină, blocați ai canalelor de calciu, inhibitori de fosfodiesterază, antagoniști de angiotensină de tipul 2 și/sau blocați/inhibitori de citokine.

În particular, agenții terapeutici polipeptidici din dezvoltarea de față sunt utili pentru tratamentul sau prevenirea unui cancer (tumori). Termenii "cancer" și "malign" se referă la, sau descriu, starea fiziologică de la mamifere care este caracterizată tipic prin creștere/proliferație celulară necontrolată. Exemple de cancer sau afecțiuni neoplazice, includ dar nu sunt limitate la, carcinom, limfom, blastom, sarcom și leucemie. Exemple mai specifice de astfel de cancere includ cancer cu celule scuamoase, cancer al peritoneului, cancer hepatocelular, cancer gastrointestinal, cancer pancreatic, glioblastom, cancer de col uterin, cancer ovarian, cancer hepatic, cancer vezical, hepatom, cancer mamar, cancer de colon, cancer colorectal, carcinom endometrial sau uterin, carcinom al glandelor salivare, cancer renal, cancer de prostată, cancer vulvar, cancer de tiroidă, carcinom hepatic, cancer intestinal, cancer de piele, cancer osos, gastric cancer, melanom și diferite tipuri de cancer al capului și gâtului, incluzând cancer al capului și gâtului cu celule scuamoase. Alte exemple de afecțiuni neoplazice și stări asociate includ carcinoame esofagiene, tecoame, adroblastoame, hiperplazie endometrială, endometrioza, fibrosarcoame, coriocarcinom, carcinom nazofaringian, carcinoame laringiene, hepatoblastom, sarcom Kaposi, carcinoame de piele, hemangiom, hemangiom cavernos, hemangioblastom, retinoblastom, astrocitom, glioblastom, Schwannom, oligodendrogliom, meduloblastom, neuroblastoame, rabdomiosarcom, sarcom osteogenic, leiomiosarcoame, carcinoame ale tractului urinar, tumoră Wilm, carcinom al celulelor renale, carcinom de prostată, proliferație vasculară anormală asociată cu facomatoze și sindrom Meigs. Un cancer care se pretează în special la tratamentul cu agenții terapeutici descriși aici poate fi caracterizat prin una sau mai multe dintre următoarele: cancerul are niveluri ridicate de TβRII detectabile în tumoră sau ser, niveluri de exprimare sau activitate biologică crescută a TGFβ1 sau TGFβ3, este metastatic sau la risc de a deveni metastatic sau orice combinație a acestora.

În unele cazuri de astfel de metode, pot fi administrați unul sau mai mulți agenți terapeutici polipeptidici, împreună (simultan) sau în momente diferite (pe rând). În plus, agenții terapeutici polipeptidici pot fi administrați cu un alt tip de compuși pentru tratamentul cancerului sau pentru inhibarea angiogenezei.

În unele cazuri, metodele subiect conform dezvoltării pot fi utilizate singure. Alternativ, metodele subiect pot fi utilizate în combinație cu alte abordări terapeutice anticancer convenționale țintite la tratamentul sau prevenirea afecțiunilor proliferative (de exemplu, tumori). De exemplu, astfel de metode pot fi utilizate în prevenirea profilactică a cancerului, prevenirea recidivei cancerului și metastazelor după chirurgie și ca terapie adjuvantă pentru o altă terapie convențională a cancerului. Dezvoltarea de față recunoaște că eficiența eficiența terapiilor convenționale împotriva cancerului (de exemplu, chimioterapie, radioterapie, fototerapie, imunoterapie, și chirurgie) poate fi crescută prin utilizarea unui agent terapeutic peptidic subiect.

A fost arătat că o gamă largă de compuși convenționali au activități anti-neoplazice sau anti-cancer. Acești compuși au fost utilizați ca agenți farmaceutici în chimioterapie pentru a scădea dimensiunea tumorilor solide, preveni metastazele și creșterea suplimentară sau pentru a scădea numărul de celule maigne în cancerele leucemice sau ale măduvei osoase. Deși chimioterapia a fost eficientă pentru prevenirea diferitelor tipuri de boli maligne, mulți compuși anti-neoplazici induc efecte secundare nedorite. A fost arătat că atunci când sunt combinate două sau mai multe tratamente diferite, tratamentele pot acționa sinergic și permite reducerea dozelor pentru fiecare dintre tratamente, reducând astfel efectele secundare dăunătoare exercitate de fiecare compus la doze mai înalte. În alte cazuri, bolile maligne care sunt refractare la un tratament pot răspunde la o terapie de combinație cu două sau mai multe tratamente diferite.

Atunci când un agent terapeutic dezvoltat aici este administrat în combinație cu un alt agent anti-neoplazic convențional, fie concomitent, fie pe rând, un astfel de agent terapeutic poate crește efectul terapeutic al agentului anti-neoplazic sau depăși rezistența celulară la un astfel de agent anti-neoplazic. Aceasta permite scăderea dozelor unui agent anti-neoplazic, reducând prin urmare efectele secundare nedorite, sau restabilește eficiența unui agent anti-neoplazic în celule rezistente.

Conform dezvoltării de față, agenții terapeutici polipeptidici descriși aici pot fi utilizați în combinație cu alte compoziții și proceduri pentru tratamentul bolilor. De exemplu, o tumoră poate fi

tratată convențional chirurgical, prin radioterapie sau chimioterapie combinată cu polipeptida T β R β II, și apoi polipeptida T β R β II poate fi administrată ulterior pacientului pentru a se prelungi inactivitatea micrometastazelor și pentru stabilizarea oricărei tumori primare restante.

Aici sunt descriși de asemenea alți agenți terapeutici utili pentru terapia de combinație a tumorilor cu o polipeptidă T β R β II incluzând alte terapii împotriva cancerului: de exemplu, chirurgie, agenți citotoxici, radioterapia care implică iradierea sau administrarea de substanțe radioactive, agenți chimioterapeutici, agenți anti-hormonali, agenți de inhibare a creșterii, compoziții antineoplazice și tratamentul cu agenți anticancer enumerați aici și cunoscuți în domeniu, sau combinații ale acestora.

Așa cum este utilizat aici, termenul "agent citotoxic" se referă la o substanță care inhibă sau previne funcția celulelor și/sau duce la distrugerea celulelor. Termenul este intenționat a include izotopi radioactivi (de exemplu, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² și izotopi radioactivi ai Lu), agenți chimioterapeutici de exemplu metotrexat, adriamicină, alcaloizi vinca (vincristină, vinblastină, etoposid), doxorubicină, melfalan, mitomicină C, clorambucil, daunorubicină sau alți agenți intercalanți, enzime și fragmente ale acestora așa cum sunt enzime nucleolitice, antibiotice și toxine așa cum sunt toxine cu moleculă mică sau toxine active enzimatic de origine bacteriană, fungică, de la plante sau animale, incluzând fragmente și/sau variante ale acestora și diferiți agenți antitumorali sau anticancer dezvăluiți mai jos. Alți agenți citotoxici sunt desciși mai jos. Un agent tumoricid cauzează distrugerea celulelor tumorale.

Un "agent chimioterapeutic" este un compus chimic util pentru tratamentul cancerului. Exemple de agenți chimioterapeutici includ agenți de alchilare așa cum sunt tiotepa și ciclofosfamidă CYTOXAN[®]; alchil sulfonați așa cum sunt busulfan, improsulfan și piposulfan; aziridine precum benzodopa, carbocuană, meturedopa, și uredopa; etilenimine și metilamelamine incluzând altretamină, trietilenmelamină, trietilenfosforamidă, trietilentiofosforamidă și trimetilolomelamină; acetogenine (în special bulatacin și bulatacinonă); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL[®]); beta-lapacina; lapacol; colchicine; acid betulinic; o camptotecină (incluzând analogul sintetic topotecan (HYCAMTIN[®]), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR[®]), acetilcamptotecină, scoplectină și 9-aminocamptotecină); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluzând analogii săi sintetici adozelesină, carzelesină și bizelesină); podofilotoxină; acid podofilinic; teniposid; criptocine (în special criptoficina 1 și criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluzând analogii sintetici, KW-2189 și CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; o sarcodictină; spongistatina; muștaruri azotate așa cum sunt clorambucil, clornafazina, ciclofosfamidă, estramustina, ifosfamidă, mecloretamina, clorhidrat de oxid de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamidă, muștar uracil; nitrozuree așa cum sunt carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina și ranimustina; antibiotice așa cum sunt antibioticele enediene (de exemplu, calicheamicina, în special calicheamicina gama II și calicheamicina omega II (vezi, de exemplu, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluzând dinemicina A; o esperamicina; cât și cromofor neocarzinostatina și cromofori antibiotice enediene cromoproteine înrudite), aclacinomicine, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicine, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN[®] doxorubicina (incluzând morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirolino-doxorubicina și deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicine așa cum este mitomicina C, acid micofenolic, nogalamicina, olivomicine, peplomicine, porfiromicine, puromicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozotocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metaboliți așa cum sunt metotrexat și 5-fluorouracil (5-FU); analogi de acid folic așa cum sunt denopterina, metotrexat, pteropterină, trimetrexat; analogi de purine precum fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; analogi de pirimidină așa cum sunt ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; androgeni așa cum sunt calusteron, propionat de dromostanolon, epitiostanol, mepitiostan, testolactona; anti-suprarenale așa cum sunt aminoglutetimidă, mitotan, trilostan; surse de acid folic cum sunt acidul folinic; aceglatonă; glicozid de aldofosfamidă; acid aminolevulinic; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantrenă; edatraxat; demecolcina; diaziqonă; elfornitina; acetat de eliptiniu; o epotilonă; etoglucid; nitrat de galii; hidroxiuree; lentinan; lonidamina; maitansinoide așa cum sunt maitansina și ansamitocine; mitogazonă; mitoxantron; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantron; 2-etilhidrazid; procarbazonă; complex de polizaharide PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxan; rizoxin; sizofiran; spirogermaniu; acid tenuazonic; triaziquonă; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecene (în special toxina T-2, veracurina A, roridina A și anguidina); uretan; vindesina (ELDISINE[®], FILDESIN[®]); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosid ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, de exemplu, paclitaxel TAXOL[®] (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulare a paclitaxelului cu nanoparticule de albumină proiectate prin inginerie, fprp cremofor

ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) și doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil; gemcitabină (GEMZAR®); 6-tioguanină; mercaptopurină; metotrexat; analogi de platină cum sunt cisplatină și carboplatină; vinblastină (VELBAN®); platină; etoposid (VP- 16); ifosfamidă; mitoxantron; vincristină (ONCOVIN®); oxaliplatină; leucovovină; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexat; daunomicină; aminopterina; ibandronat; inhibitor de topoizomerază RFS 2000; difluorometilornitină (DMFO); retinoizi așa cum este acidul retinoic; capecitabină (XELODA®); săruri, acizi sau derivați acceptabile farmaceutic ale oricăra dintre cei de mai sus; cât și combinații de două sau mai multe dintre cele de mai sus, așa cum este CHOP, o abreviere a unei terapii de combinație cu ciclofosfamidă, doxorubicină, vincristină și prednison, și FOLFOX, o abreviere pentru un regim de tratament cu oxaliplatin (ELOXATIN™) combinată cu 5-FU și leucovovină.

În această definiție sunt incluși de asemenea agenți anti-hormonali care acționează pentru a regla, reduce, bloca sau inhiba efectele hormonilor care pot promova creșterea cancerului și care sunt dese ori sub formă de tratament sistemic sau al întregului organism. Aceștia pot fi ei înșiși hormoni. Exemple includ anti-estrogeni și modulatori selectivi ai receptorului pentru estrogen (SERM), incluzând, de exemplu, tamoxifen (incluzând tamoxifen NOLVADEX®), raloxifen EVISTA®, droloxifen, 4-hidroxitamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY1 17018, onapristonă și toremifen FARESTON®; anti-progesterone; reglatori la nivel scăzut ai receptorului pentru estrogen (ERD); agenți care funcționează în sensul suprimării sau blocării ovarelor, de exemplu, agoniști ai hormonului de eliberare a hormonului luteinizant (LHRH) așa cum sunt acetat de leuprolid LUPRON® și ELIGARD®, acetat de goserelină, acetat de buserelină și tripterelină; alți anti-androgeni așa cum sunt flutamidă, nilutamidă și bicalutamidă; și inhibitori ai aromatazei care inhibă enzima aromatază, care reglează producerea de estrogen din glandele suprarenale, așa cum sunt, de exemplu, 4(5)-imidazoli, aminoglutetimidă, acetat de megestrol MEGASE®, exemestan AROMASIN®, formestan, fadrozol, vorozol RIVIS OR®, letrozol FEMARA® și anastrozol ARIMIDEX®. În plus, o astfel de definiție a agenților chimioterapeutici include bisfosfonați așa cum sunt clodronat (de exemplu, BONEFOS® sau OSTAC®), etidronat DIDROC AL®, NE-58095, acid zoledronic/zoledronat ZOMET A®, alendronat FOSAMAX®, pamidronat AREDIA®, tiludronat SKELID® sau risedronat ACTONEL®; cât și troxacitabină (un analog nucleozidic 1,3-dioxolan citozină); oligonucleotide antisens, în special cele care inhibă exprimarea genelor din căile de semnalizare implicate în proliferarea anormală a celulelor, așa cum sunt, de exemplu, PKC-alfa, Raf, H-Ras și receptorul factorului de creștere epidermic (EGF-R); vaccinuri așa cum sunt vaccinul THERATOPE® și vaccinuri pentru terapie genică, de exemplu, vaccinul ALLOVECTIN®, vaccinul LEUVECTIN® și vaccinul VAXID®; inhibitor al topoizomerazei 1 LURTOTECAN®, rmRH ABARELIX®; ditosilat de lapatinib (un inhibitor de tirozin kinaze cu moleculă mică dual pentru ErbB-2 și EGFR cunoscut și ca GW572016); și săruri acizi sau derivați acceptabile farmaceutic ale oricăra de mai sus.

Când este utilizat aici, un "agent de inhibare a creșterii" se referă la un compus sau compoziție care inhibă creșterea unei celule fie in vitro, fie in vivo. Astfel, agentul de inhibare a creșterii poate fi unul care reduce semnificativ procentul celulelor în faza S. Exemple de agenți de inhibare a creșterii includ agenți care blochează evoluția ciclului celular (în alt moment decât faza S), așa cum sunt agenți care induc blocarea în G1 sau blocarea în faza M. Blocanți în faza M clasici includ vinca (vincristină și vinblastină), taxanii și inhibitori ai topoizomerazei II aa cum sunt doxorubicină, epirubicină, daunorubicină, etoposid și bleomicină. Acei agenți care blochează în G1 se revarsă și în blocarea în faza S, de exemplu, agenții de alchilare a ADN-ului așa cum sunt tamoxifen, prednison, dacarbazină, mecloretamină, cisplatină, metotrexat, 5-fluorouracil și ara-C. Informații suplimentare pot fi găsite în The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn și Israel, ed., Capitolul 1, intitulat "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami și colab. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), în special p. 13. Taxanii (paclitaxel și docetaxel) sunt medicamente împotriva cancerului derivate amândouă din tisa. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone -Poulenc Rorer), derivat din tisa europeană, este un analog semisintetic al paclitaxelului (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel și docetaxel promovează asamblarea microtubulilor din dimeri de tubulină și stabilizează microtubulii prin prevenirea depolimerizării, ceea ce duce în celule la inhibarea mitozei.

În încă alte cazuri, polipeptidele TβRII pot fi utile în tratamentul sau prevenirea fibrozei. Așa cum este utilizat aici, termenul "fibroză" se referă la formarea anormală sau dezvoltarea de țesut conjunctiv fibros în exces de către celulele dintr-un organ sau țesut. Deși procesele asociate fibrozei pot apărea ca parte a formării și reparării țesuturilor normale, dereglarea acestor procese poate duce la compoziție celulară modificată și depozitare excesivă de țesut conjunctiv care afectează progresiv funcția țesutului sau organului. Formarea țesutului fibros poate rezulta dintr-un proces de reparare sau reactiv. Afecțiunile sau stările fibrotice includ, dar nu sunt limitate la, afecțiuni fibroproliferative asociate cu boli vasculare, așa cum este boala cardiacă, boala cerebrală, și boala vasculară periferică, cât și țesuturi sau

sisteme de organe care includ cordul, pielea, rinichii, peritoneul, intestinul și ficatul (cum este dezvoltat, de exemplu, în Wynn, 2004, Nat Rev 4:583-594).

Afecțiuni exemplificatoare care pot fi tratate includ, dar nu sunt limitate la, fibroză renală, incluzând nefropatii asociate cu leziuni/fibroză, de exemplu, nefropatii cronice asociate diabetului (de exemplu, nefropatie diabetică), lupusului, sclerodermiei, nefritei glomerulare, sclerozei glomerulare focale segmentare și nefropatiei cu IgA; fibroză intestinală, de exemplu, sclerodermie și fibroză intestinală indusă de iradiere; fibroză hepatică, de exemplu, ciroză, fibroză hepatică indusă de alcool, leziunea ductelor biliare, ciroză biliară primară, fibroză hepatică indusă viral sau infecțios, fibroză hepatică congenitală și hepatită autoimună; și alte stări fibrotice, așa cum sunt fibroză chistică, fibroză endomiocardică, fibroză mediastinală, sarcoidoză, sclerodermie, leziunea/fibroza măduvei spinale, mielofibroză, restenoze vasculare, ateroscleroză, fibroză la locul de injectare (care poate apărea ca o complicație a injecțiilor intramusculare, în special la copii), fibroză endomiocardică, fibroză retroperitoneală și fibroză sistemică nefrogenă.

Așa cum este utilizat aici, termenii "afecțiune fibrotică", "stare fibrotică" și "boală fibrotică" sunt utilizați interschimbabil pentru a se referi la o afecțiune, stare sau boală caracterizată prin fibroză. Exemple de afecțiuni fibrotice includ, dar nu sunt limitate la lupus, afecțiuni sclerotice (de exemplu, sclerodermie, ateroscleroză și scleroză sistemică incluzând, de exemplu, scleroză sistemică difuză și scleroză sistemică progresivă), fibroză vasculară, fibroză pancreatică, fibroză hepatică (de exemplu, ciroză), fibroză renală, fibroză musculoscheletică, fibroză cardiacă (de exemplu, fibroză endomiocardică, miocardiopatie idiopatică), fibroza pielii (de exemplu, sclerodermie, post-traumatică, cicatrici cutanate operatorii, cicatrici cheloide și formațiuni cheloide cutanate), fibroză oculară (de exemplu, glaucom, scleroza oculară, cicatrici conjunctivale și corneale și pterigion), mielofibroză, boală cronică grefă contra gazdă, boală Peyronie, stenoză uretrală post-cistoscopică, fibroză retroperitoneală idiopatică și indusă farmacologic, fibroză mediastinală, fibroză proliferativă, fibroză neoplazică, boala Dupuytren, stricturi, glioza, cicatrizare dermică, fibroză pulmonară idiopatică și fibroză indusă prin iradiere.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele dezvoltate aici (de exemplu, o polipeptidă care are secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 13 și 50-56) poate fi utilizată, singură sau în combinație cu una sau mai multe terapii sau agenți activi de susținere, pentru a trata, preveni sau reduce rata evoluției și/sau severitatea unei boli pulmonare interstițiale (de exemplu, fibroză pulmonară idiopatică). În unele cazuri, boala pulmonară interstițială este fibroză pulmonară. În unele cazuri, boala pulmonară interstițială este cauzată de oricare dintre următoarele: silicoză, azbestoză, berilioză, pneumonita de hipersensibilitate, utilizarea medicamentelor (de exemplu, antibiotice, medicamente chimioterapeutice, agenți antiaritmie, statine), scleroză sistemică, polimiozită, dermatomiozită, lupus eritematos sistemic, artrită reumatoidă, o infecție (de exemplu, pneumonie atipică, pneumonia cu pneumocystis, tuberculoză, chlamydia trachomatis, și/sau virusul sincițial respirator), limfangită carcinomatoasă, fumat sau afecțiuni ale dezvoltării. În unele cazuri, boala pulmonară interstițială este idiopatică (de exemplu, sarcoidoză, fibroză pulmonară idiopatică, sindrom Hamman-Rich, și/sau sindrom anti-sintetază). În cazuri particulare, boala pulmonară interstițială este fibroză pulmonară idiopatică. În unele cazuri, tratamentul fibrozei pulmonare idiopatice este administrat în combinație cu un agent terapeutic suplimentar. În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este selectat din grupul care constă în: pirfenidonă, N-acetilcisteină, prednison, azatioprină, nintedanib, derivați ai acestora și combinații ale acestora.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele dezvoltate aici (de exemplu, o polipeptidă care are secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 13 și 50-56) poate fi utilizată, singură sau în combinație cu una sau mai multe terapii sau agenți activi de susținere, pentru a trata, preveni sau reduce rata evoluției și/sau severitatea unei boli sau stări asociate rinichilor. Așa cum este utilizat aici, "boală sau stare asociată rinichilor" se poate referi la orice boală, afecțiune sau stare care afectează rinichii sau sistemul renal. Exemple de boli sau stări asociate rinichilor includ, dar nu sunt limitate la, boli (sau insuficiență) renale cronice, boli (sau insuficiență) renale acute, boli renale primare, boli renale nediabetice, glomerulonefrită, nefrită interstițială, boli renale diabetice, nefropatie diabetică, glomeruloscleroză, glomerulonefrită cu evoluție rapidă, fibroză renală, sindrom Alport, nefrită IDDM, glomerulonefrită proliferativă mesangială, glomerulonefrită membrano-proliferativă, glomerulonefrită crescentică, fibroză interstițială renală, glomeruloscleroză focală segmentară, nefropatie membranoasă, boală cu schimbări minime, glomerulonefrită pauci-imună cu evoluție rapidă, nefropatie cu IgA, boala rinichiului polichistic, boala Dent, nefrocalcinoză, nefrită Heymann, boala rinichiului polichistic autozomal dominantă (a adultului), boala rinichiului polichistic autozomal recesivă (a copilăriei), leziuni renale acute, sindrom nefrotic, ischemie renală, boli sau afecțiuni ale podocitelor, proteinurie, boli glomerulare, glomerulonefrită membranoasă, glomerulonefrită focală segmentară, pre-eclampsie, eclampsie, leziuni renale, boli de collagen vasculare, proteinurie benignă ortostatică (posturală), nefropatie

cu IgM, nefropatie membranoasă, sarcoidoză, diabet zaharat, afectarea medicamentoasă a rinichilor, boala Fabry, aminoaciduria, sindrom Fanconi, nefroscleroză hipertensivă, nefrită interstițială, anemia cu celule falciforme, hemoglobinuria, mioglobinuria, granulomatoza Wegener, boala depozitării glicogenului de tip 1, boală renală cronică, insuficiență renală cronică, rată de filtrare glomerulară (GFR) scăzută, nefroangioscleroză, nefrită lupică, glomerulonefrită pauci-imună crescentică pozitivă pentru ANCA, nefropatie cronică a alogrefei, nefrotoxicitate, toxicitate renală, necroză renală, lezare renală, lezare glomerulară și tubulară, disfuncție renală, sindrom nefritic, insuficiență renală acută, insuficiența renală cronică, disfuncția tubulor proximali, respingere acută de transplant renal, respingere cronică de transplant renal, glomerulonefrită proliferativă mesangial fără IgA, glomerulonefrită postinfecțioasă, vasculite cu implicare renală de orice tip, orice boală renală hereditară, orice nefrită interstițială, respingerea transplantului renal, cancer renal, boală renală asociată altor stări (de exemplu, hipertensiune, diabet, și boală autoimună), boala Dent, nefrocalcinoză, nefrită Heymann, boală renală primară, glomerulopatie cu colaps, boală cu depozite dense, o glomerulonefrită asociată crioglobulinemiei, o boală Hensch-Schonlein, o glomerulonefrită postinfecțioasă, o endocardită bacteriană, o poliangeită microscopică, un sindrom Churg-Strauss, o glomerulonefrită mediată de anticorpi anti-GBM, amiloidoză, o boală de depozitare a imunoglobulinelor monoclonale, o glomerulonefrită fibrilară, o glomerulopatie imunotactoidă, lezare tubulară ischemică, o tubulo-nefrită interstițială indusă de medicamente, o tubulo-nefrită interstițială toxică, o tubulo-nefrită interstițială infecțioasă, o pielonefrită bacteriană, o tubulo-nefrită interstițială infecțioasă virală care apare în urma infecției cu virusul polioma sau unei infecții cu HIV, o boală tubulo-interstițială indusă metabolic, o boală mixtă de țesut conjunctiv, o nefropatie mielomatoasă, o nefropatie cu cristale care poate rezulta din depunerea de cristale indusă medicamentos sau de urat sau oxalat, o respingere a alogrefei tubulo-interstițiale celulare, o boală tumorală infiltrativă care apare din cauza unui limfom sau unei boli limfoproliferative post-transplant, o boală renală obstructivă, boală vasculară, o microangiopatie trombotică, o nefroangioscleroză, o boală ateroembolică, o boală mixtă de țesut conjunctiv, o poliarterită nodoasă, o boală vasculară indusă de inhibitori de calcineurină, o respingere de alogrefă celulară vasculară acută, o respingere de alogrefă umorală acută, scădere precoce a funcției renale (ERFD), boală renală în stadiu terminal (ESRD), tromboza venelor renale, necroză tubulară acută, nefrită interstițială acută, boală renală cronică stabilită, stenoza arterei renale, nefropatie ischemică, uremie, tubulonefrită interstițială cronică indusă de medicamente și toxine, nefropatie de reflux, litiază renală, sindrom Goodpasture, anemie normocromă normocitară, anemie renală, boală renală cronică diabetică, boală asociată cu IgG4, sindrom von Hippel-Lindau, scleroză tuberoasă, nefronoftizie, boală renală chistică medulară, carcinom al celulelor renale, adenocarcinom, nefroblastom, limfom, leucemie, afecțiune de hiposialilare, nefropatie cronică cauzată de ciclosporine, leziune de reperfuzie renală, displazie renală, azotemie, ocluzie arterială bilaterală, nefropatie urică acută, hipovolemie, uropatie bilaterală obstructivă acută, nefropatie hipercalcemică, sindrom uremic hemolitic, retenție urinară acută, nefroscleroză malignă, glomeruloscleroză postpartum, sclerodermie, boală anti-GBM diferită de Goodpasture, poliarterită nodoasă microscopică, granulomatoză alergică, nefrită acută de iradiere, glomerulonefrită post-streptococică, macroglobulinemie Waldenstrom, nefropatie analgezică, fistulă arteriovenoasă, grefă arteriovenoasă, dializă, rinichi ectopic, rinichi spongios medular, osteodistrofie renală, rinichi unic, hidronefroză, microalbuminurie, uremie, hematurie, hiperlipidemie, hipoalbuminemie, lipidurie, acidoză, hiperpotasemie și edem.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele dezbătute aici (de exemplu, o polipeptidă care are secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 13 și 50-56) poate fi utilizată, singură sau în combinație cu una sau mai multe terapii sau agenți activi de susținere, pentru a trata, preveni sau reduce rata evoluției și/sau severitatea bolii renale cronice (de exemplu, leziuni tisulare, inflamație și/sau fibroză). Boala renală cronică (CKD), cunoscută și ca boala cronică a rinichilor, este o pierdere progresivă a funcției renale pe o perioadă de luni sau ani. Simptomele de înrăutățire a funcției renale pot include starea de rău general și apetitul scăzut. Deseori, boala renală cronică este diagnosticată în urma screeningului persoanelor cunoscute a fi la risc de a dezvolta probleme renale, așa cum sunt cei cu hipertensiune arterială sau diabet și al celor cu antecedente heredocolaterale de CKD. Această boală poate fi identificată atunci când duce la una dintre complicațiile ei cunoscute, precum boală cardiovasculară, anemie sau pericardită. Ghidurile profesionale recente clasifică severitatea CKD în cinci stadii, cu stagiul 1 fiind cel mai blând și cauzând de regulă puțin simptome și stagiul 5 fiind o boală gravă cu speranță de viață rezervată dacă este lăsată netratată. CKD în stadiul 5 este numită deseori boală renală în stadiu final, boala rinichilor în stadiu final sau insuficiență renală în stadiu final și este în mare parte sinonimă cu termenii acum depășiți de insuficiență renală cronică sau insuficiență cronică a rinichilor; și înseamnă de obicei că pacientul necesită terapie de înlocuire a funcției renale, care poate implica o formă de dializă, dar constă ideal într-un transplant renal. CKD nu are inițial simptome specifice și este în general detectată doar ca o creștere a creatininei serice sau a proteinelor din urină. Pe măsură ce scade funcția renală, se pot

manifesta diferite simptome așa cum sunt descrise mai jos. Poate fi crescută tensiunea arterială ca urmare a supraîncărcării cu lichide și producerii de hormoni vasoactivi produși de rinichi prin intermediul sistemului renină-angiotensină, care crește riscul dezvoltării hipertensiunii și/sau dezvoltării insuficienței cardiace congestive. Se poate acumula ureea, conducând la azotemie și în final la uremie (simptome care variază de la letargie la pericardită și encefalopatie). Datorită valorii înalte în circulația sistemică, urea este excretată în concentrații mari în transpirația ecrină și cristalizează pe piele pe măsura evaporării transpirației ("chiciură uremică"). se poate acumula în sânge potasiul (hiperpotasemie cu o plajă de simptome incluzând starea de rău și aritmii cardiace potențial fatale). Hiperpotasemia nu apare de obicei până când rata de filtrare glomerulară scade la valori mai mici de 20-25 ml/min/1,73 m², moment în care rinichii au o capacitate scăzută de a excreta potasiul. Hiperpotasemia din CKD poate fi exacerbată de acidoză (care duce la deplasarea extracelulară a potasiului) și de lipsa insulinei. Poate scădea sinteza de eritropoietină, ducând la anemie. Pot apărea simptome de suprasolicitare cu volum de lichide, care variază de la edem blând la edem pulmonar amenințător pentru viață. Poate părea hiperfosfatemia, cauzată de excreție redusă a fosfatului, în general în urma scăderii filtrării glomerulare. Hiperfosfatemia este asociată cu risc cardiovascular crescut, fiind un stimul direct pentru calcificarea vasculară. Poate apărea hipocalcemia, care este în general cauzată de stimularea cu factorul 23 de creștere al fibroblastilor. Osteocitele sunt responsabile de creșterea producției de FGF23, care este un inhibitor potent al enzimei 1-alfa-hidroxiilază (responsabilă cu conversia 25-hidroxicolecalciferolului în 1,25 dihidroxivitamina D3). Ulterior, aceasta evoluează în hiperparatiroidie secundară, osteodistrofie renală și calcificare vasculară care afectează suplimentar funcția cardiacă. Poate apărea acidoza metabolică (prin acumularea de sulfați, fosfați, acid uric etc.) și cauza activitate enzimatică alterată prin acțiunea acidului în exces asupra enzimelor; și, de asemenea, excitabilitate crescută a membranelor cardiace și neuronale prin promovarea hiperpotasemiei de către acidul în exces (acidoză). Acidoza este cauzată de asemenea de capacitatea redusă de a se genera suficient amoniac în celulele tubilor proximali. Anemia cu deficit de fier, a cărei apariție crește ca frecvență pe măsură ce scade funcția renală, este prevalentă în special la cei care necesită haemodializa. Are cauze multifactoriale, care includ inflamație crescută, reducerea eritropoietinei și hiperuricemia care duce la suprimarea măduvei osoase. Persoanele cu CKD suferă de ateroscleroză accelerată și au probabilitate mai mare comparativ cu populația generală să dezvolte boli cardiovasculare. Pacienții care suferă de CKD și boli cardiovasculare tind să aibă prognostic semnificativ mai prost comparativ cu cei care suferă doar de cea din urmă. În unele cazuri, boala renală cronică este o boală renală cronică cu afectare minerală a oaselor, un sindrom larg de afecțiuni scheletice, cardiovasculare, și metabolice minerale asociate între ele care apar în urma bolii renale. CKD-MBD cuprinde diferite patologii scheletice numite deseori osteodistrofie renală (ROD), care este un caz preferat pentru tratamentul cu oricare dintre polipeptidele dezvoltate aici, sau combinații cu unul sau mai multe terapii sau agenți activi de susținere. În funcție de contribuția relativă a diferiților factori patogeni, ROD se manifestă în modele patologice diferite de remodelare osoasă (Hruska și colab., 2008, Chronic kidney disease mineral bone disorder (CKD-MBD); în Rosen și colab. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, ed. a 7-a American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C., pp 343-349). La un capăt al spectrului este ROD cu osteodistrofie uremică și turnover osos redus, caracterizată printr-un număr scăzut de situsuri de remodelare active, formare osoasă suprimată marcat și resorbție osoasă joasă. La cealaltă extremă este ROD cu hiperparatiroidie, turnover osos înalt și osteită fibroasă.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele (de exemplu, o polipeptidă care are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 13 și 50-56) dezvoltate aici poate fi utilizată, singură sau în combinație cu una sau mai multe terapii sau agenți activi de susținere, pentru a trata, preveni sau reduce rata evoluției și/sau severitatea mielofibrozei (de exemplu, mielofibroză primară, mielofibroză post-policitemia vera, și mielofibroză post-trombocitemia esențială). În special, antagoniștii ActRIIB pot fi utilizați, singuri sau în combinație cu una sau mai multe terapii sau agenți activi de susținere, pentru a trata, preveni sau reduce rata evoluției și/sau severitatea uneia sau mai multor complicații ale mielofibrozei incluzând, de exemplu, hematopoieza inefficientă, anemia, inflamația, fibroza (de exemplu, fibroza măduvei osoase, fibroza splenică și fibroza hepatică), pancitopenia, trombocitopenia, hematopoieza extramedulară (de exemplu, hematopoieza extramedulară splenică, hematopoieza extramedulară hepatică, hematopoieza extramedulară pulmonară și hematopoieza extramedulară limfatică), hepatomegalia, splenomegalia, osteoscleroza, osteomielofibroza, poikilocitoza, oboseala, pierderea în greutate, transpirațiile nocturne, febra, pruritusul, durerile osoase, sațietatea precoce, durerea sau disconfortul abdominal, artralgiile, mialgiile, parastezia, cașexia, infarctul splenic și sângerările.

Așa cum este utilizat aici, inhibarea răspunsului fibrotic al unei celule, include, dar nu este limitată la inhibarea răspunsului fibrotic al uneia sau mai multor celule din ficat (sau țesutul hepatic); uneia sau mai multor celule din rinichi (sau țesutul renal); uneia sau mai multor celule din țesutul

muscular; uneia sau mai multor celule din cord (sau țesutul cardiac); uneia sau mai multor celule din pancreas; uneia sau mai multor celule din piele; uneia sau mai multor celule din os, uneia sau mai multor celule din vasculatură, uneia sau mai multor celule stem sau uneia sau mai multor celule din ochi.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele TβRII conform dezvoltării pot fi utilizate pentru tratamentul unei boli sau afecțiuni autoimune. În unele cazuri, boala sau afecțiunea autoimună este selectată din grupul care constă în: spondiloartropatii; spondilită anchilozantă, artrită, artrită/spondilită psoriazică, artrită enteropatică, artrită reactivă, sindrom Reiter, spondiloartropatii nediferențiate; artrită reactivă, reumatism, sindromul inflamator al intestinului, boală Crohns, artrită reumatoidă, spondilită reumatoidă, osteoartrită, artrită gutoasă, alergice, scleroză multiplă, diabet autoimun, uveită autoimună și sindrom nefrotic.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele TβRII conform dezvoltării pot fi utilizate pentru tratamentul unei afecțiuni metabolice. În unele cazuri, afecțiunea metabolică este obezitatea sau diabetul (de exemplu, diabetul de Tip I sau de Tip II), boala steatozei hepatice, neuropatie diabetică, neuropatie periferică, retinopatie diabetică, ulceratii diabetice, ulceratii retinopatie, macrovasculopatie diabetică.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele TβRII conform dezvoltării pot fi utilizate pentru tratamentul unei boli infecțioase sau în urma unui transplant de organ sau țesut.

În unele cazuri, oricare dintre polipeptidele TβRII conform dezvoltării pot fi utilizate pentru tratamentul bronhopneumopatiei obstructive cronice (COPD), afecțiunii cronice obstructive a căilor respiratorii, fibroză pulmonară idiopatică și/sau astm. Parțial, dezvoltarea se referă de asemenea la metode de tratament a hipertensiunii pulmonare (de exemplu, hipertensiunii pulmonare arteriale) care cuprind administrarea unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă TβRII (de exemplu, o polipeptidă care cuprinde secvența de aminoacizi din oricare dintre SEQ ID NO: 13 și 50-56) către un pacient care are nevoie de aceasta. În unele cazuri, dezvoltarea consideră metode de tratament al uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare (de exemplu, proliferarea celulelor musculare netede și/sau endoteliale din artera pulmonară, angiogeneza din artera pulmonară, dispneea, durerile toracice, remodelare vasculară pulmonară, hipertrofie ventriculară dreaptă și fibroză pulmonară) care cuprind administrarea unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă TβRII către un pacient care are nevoie de aceasta. În unele cazuri, dezvoltarea consideră metode de prevenire a uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare care cuprind administrarea unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă TβRII către un pacient care are nevoie de aceasta. În unele cazuri, dezvoltarea consideră metode pentru reducerea ratei de evoluție a hipertensiunii pulmonare care cuprind administrarea unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă TβRII către un pacient care are nevoie de aceasta. În unele cazuri, dezvoltarea consideră metode de reducere a ratei de evoluție a uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare care cuprind administrarea unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă TβRII către un pacient care are nevoie de aceasta. În unele cazuri, dezvoltarea consideră metode de reducere a severității hipertensiunii pulmonare care cuprind administrarea unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă TβRII către un pacient care are nevoie de aceasta. În unele cazuri, dezvoltarea consideră metode de reducere a severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare care cuprind administrarea unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă TβRII către un pacient care are nevoie de aceasta. Opțional, metodele dezvoltate aici pentru tratamentul, prevenirea sau reducerea ratei de evoluție și/sau severității hipertensiunii pulmonare, în special pentru tratamentul, prevenirea sau reducerii ratei de evoluție și/sau severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare, pot cuprinde suplimentar administrarea către pacient a uneia sau mai multor terapii sau agenți activi suplimentari de susținere pentru tratamentul hipertensiunii pulmonare.

Dezvoltarea de față consideră utilizarea polipeptidelor TβRII în combinație cu una sau mai multe alte modalități terapeutice. Astfel, în plus față de utilizarea polipeptidelor TβRII, subiectului îi poate fi administrată de asemenea una sau mai multe terapii "standard" pentru tratamentul afecțiunilor fibrotice. De exemplu, polipeptidele TβRII pot fi administrate în combinație cu (adică, împreună cu) citotoxine, agenți imunosuprimanți, agenți radiotoxici și/sau anticorpi terapeutici. Agenți co-terapeutici specifici considerați aici includ, dar nu sunt limitați la, steroizi (de exemplu, corticosteroizi, cum este prednisonul), agenți imunosuprimanți și/sau anti-inflamatori (de exemplu, interferon gama, ciclofosfamidă, azatioprină, metotrexat, penicilamină, ciclosporină, colchicină, globuline antitumorigene, mofetil de micofenolat și hidroxichlorochină), medicamente citotoxice, blocanți ai canalelor de calciu (de exemplu, nifedipină), inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei (ACE), acid para-aminobenzoic (PABA), dimetilsulfoxid, inhibitori ai factorului de creștere și transformare beta (TGFβ), inhibitori ai interleukinei-5 (IL-5) și inhibitori universali ai caspazelor.

Agenți anti-fibrotici suplimentari care pot fi utilizați în combinație cu polipeptidele TβRII includ, dar nu sunt limitați la, lectine (așa cum este descris de exemplu în Brevetul U.S. Nr.: 7.026.283) cât și agenți anti-fibrotici descriși de Wynn și colab. (2007, J Clin Invest 117 524-529). De exemplu,

agenți și terapii anti-fibrotice includ, dar nu sunt limitate la, diferite medicamente anti-inflamatoare/ imunosuprimante/ citotoxice (incluzând colchicină, azatioprină, ciclofosamidă, prednison, talidomidă, pentoxifilină și teofilină), modificatori ai semnalizării prin TGF β (incluzând relaxină, SMAD7, HGF și BMP7, cât și TGF β 1, T β RI, T β RII, EGR-I și inhibitori de CTGF), citokine și antagoniști de receptori pentru citokine (inhibitori ai IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-13, IL-21, IL-4R, IL-13R α 1, GM-CSF, TNF- α , oncostatinei M, WISP-I și PDGF), citokine și chemokine (IFN- γ , IFN- α/β , IL-12, IL-10, HGF, CXCL10 și CXCL11), antagoniști de chemokine (inhibitori de CXCL1, CXCL2, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL6, CCL17 și CCL18), antagoniști ai receptorilor de chemokine (inhibitori de CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2 și CXCR4), antagoniști de TLR (inhibitori de TLR3, TLR4 și TLR9), antagoniști ai angiogenezei (anticorpi specifici pentru VEGF și terapia de înlocuire cu adenzin deaminază), medicamente antihipertensive (beta blocanți și inhibitori de ANG 11, ACE și aldosteron), substanțe vasoactive (antagoniști de receptor ET-1 și bosentan), inhibitori ai enzimelor care sintetizează și procesează colagenul (inhibitori ai prolil hidroxilazei), antagoniști ai celulelor B (rituximab), antagoniști ai integrinelor / moleculelor de adeziune (molecule care blochează integrinele α 1 β și α v β 6, cât și inhibitori ai kinazel legate la integrine și anticorpi specifici pentru ICAM-I și VCAM-I), medicamente proapoptotice care ținesc miofibroblastele, inhibitori de MMP (inhibitori de MMP2, MMP9 și MMP12) și inhibitori de TIMP (anticorpi specifici pentru TIMP-1).

Polipectida T β RII și agentul co-terapeutic sau co-terapia pot fi administrate în aceeași formulare sau separat. În cazul administrării separate, polipectida T β RII poate fi administrată înaintea, după sau concomitent cu agentul co-terapeutic sau cu co-terapia. Un agent poate preceda sau urma administrării celuilalt agent la intervale care variază de la minute la săptămâni. În cazurile în care sunt aplicate separat la subiect două sau mai multe tipuri de agenți terapeutici, se va asigura în general că nu trece o perioadă semnificativă de timp între momentele fiecărei administrări, astfel încât aceste tipuri diferite de agenți să fie capabile în continuare să își exercite asupra țesuturilor sau celulelor țintă un efect combinat avantajos.

10. Compoziții farmaceutice

Agenții terapeutici descriși aici (de exemplu, polipectide de fuziune cu T β RII) pot fi formulați în compoziții farmaceutice. Compozițiile farmaceutice pentru utilizarea în conformitate cu dezvoltarea de față pot fi formulate în mod convențional, utilizând una sau mai multe vehicule sau excipienți acceptabili fiziologic. Astfel de formulări vor fi în general lipsite substanțial de pirogeni, în complianță cu majoritatea cerințelor reglementatoare.

În unele cazuri, metoda terapeutică conform dezvoltării include administrarea compoziției sistemic sau local ca implant sau dispozitiv. Atunci când este administrată, compoziția farmaceutică pentru utilizarea în această dezvoltare este într-o formă lipsită de pirogeni, acceptabilă fiziologic. În metodele dezvoltate aici, agenții utili terapeutic diferiți de antagoniștii de semnalizare prin T β RII care pot fi opțional incluși de asemenea în compoziție, așa cum este descris mai sus, pot fi administrați simultan sau pe rând cu compuși subiect (de exemplu, polipectidele T β RII).

Caracteristic, agenții terapeutici proteici dezvoltăți aici vor fi administrați parental și în special intravenos sau subcutanat. Compozițiile farmaceutice adecvate pentru administrarea parenterală pot cuprinde una sau mai multe polipectide T β RII în combinație cu una sau mai multe soluții, dispersii, suspensii sau emulsii apoase sau neapoase izotonice sterile, acceptabile farmaceutic, sau pudre sterile care pot fi reconstituite chiar înainte de utilizare în soluții sau dispersii sterile injectabile, care pot conține antioxidanți, tamponi, bacteriostatice, soluții care fac dormularea izotonică cu sângele pacientului intenționat sau agenți de suspendare sau îngroșare. Exemple de vehicule adecvate apoase și neapoase care pot fi utilizate în compozițiile farmaceutice conform dezvoltării includ apă, etanol, polioli (așa cum sunt glicerol, propilen glicol, polietilen glicol și asemănătoare) și amestecuri adecvate ale acestora, uleiuri vegetale, așa cum este uleiul de măsline și esteri organici injectabili, așa cum este oleatul de etil. Fluiditatea adecvată poate fi menținută, de exemplu, prin utilizarea materialelor de acoperire, așa cum este lecitina, prin menținerea dimensiunii necesare a particulelor în cazul dispersiilor și prin utilizarea agenților tensioactivi.

Compozițiile și formulările pot, dacă este dorit, prezente într-un pachet sau dispozitiv de dispensare care poate conține una sau mai multe forme de dozare unitară care conțin ingredientul activ. Pachetul poate cuprinde de exemplu folie de metal sau plastic, așa cum este un ambalaj blister. Pachetul sau dispozitivul de furnizare poate fi însoțit de instrucțiuni pentru administrare.

Suplimentar, compoziția poate fi încapsulată sau injectată într-o formă pentru furnizarea la locul unui țesut țintă. În unele cazuri, compozițiile descrise aici pot include o matrice capabilă să furnizeze la locul unui țesut țintă unul sau mai mulți compuși terapeutici (de exemplu, polipectide T β RII), furniza o structură pentru țesutul care se dezvoltă și capabilă în mod optim de a fi resorbită în organism. De

exemplu, Matricea poate furniza eliberarea lentă a polipeptidelor T β RII. Astfel de matrici pot fi formate din materiale care sunt utilizate în prezent pentru alte aplicații medicale implantate.

Alegerea materialului matricei se bazează pe biocompatibilitate, biodegradabilitate, proprietăți mecanice, aspectul cosmetic și proprietăți ale interfeței. Forma de aplicare particulară a compozițiilor subiect va defini formularea adecvată. Posibilele matrici ale compozițiilor pot fi sulfat de calciu, fosfat tricalcic, hidroxiapatită, acid polilactic și polianhidride biodegradabile și definite chimic. Alte materiale posibile sunt biodegradabile și bine definite biologic, așa cum sunt osul sau colagenul dermic. Matrici suplimentare sunt formate din proteine pure sau componente ale matricei extracelulare. Alte matrici posibile sunt nebiodegradabile și definite chimic, așa cum sunt hidroxiapatită, biosticlă, aluminați sinterizate sau alte ceramice. Matricile pot fi formate din combinații ale oricăror tipuri de material menționate mai sus, așa cum sub acid polilactic și hidroxiapatită sau colagen și fosfat tricalcic. Bioceramicele pot avea o compoziție modificată, așa cum este în cazul calciu-aluminat-fosfat și procesare modificată pentru a se modifica dimensiunea porilor, dimensiunea particulelor, forma particulelor și biodegradabilitatea.

În unele cazuri, metodele descrise aici pot fi pentru administrarea orală, de exemplu, în formă de capsule, cașete, pilule, tablete, dropsuri (utilizând o bază cu aromă, de obicei zaharoză și acacia sau tragacant), pudre, granule sau ca soluție sau suspensie într-un lichid apos sau neapos sau ca emulsie lichidă ulei în apă sau apă în ulei sau ca elixir sau sirop sau ca pastile (utilizând o bază inertă, așa cum este gelatina și glicerina sau zaharoza și acacia) și/sau ca apă de gură sau asemănătoare, fiecare conținând o cantitate predeterminată de agent ca ingredient activ. Un agent poate fi administrat de asemenea ca bolus, electuar sau pastă.

În formele solide de dozare pentru administrarea orală (capsule, tablete, pilule, drajee, pudre, granule și asemănătoare), unul sau mai mulți compuși terapeutici așa cum sunt descriși aici pot fi amestecați cu unul sau mai mulți vehiculi acceptabili farmaceutic, așa cum sunt citratul de sodiu sau fosfatul dicalcic și/sau oricare dintre următoarele: (1) agenți de umplere sau de extindere, așa cum sunt amidonuri, lactoză, zaharoză, glucoză, manitol, și/sau acid silicic; (2) agenți de legare, cum sunt, de exemplu, carboximetilceluloza, alginati, gelatină, polivinil pirolidona, zaharoza, și/sau acacia; (3) agenți de umidificare, precum glicerolul; (4) agenți de dezintegrare, precum agar-agar, carbonat de calciu, amidon din cartof sau tapioca, acid alginic, anumiți silicați și carbonat de sodiu; (5) agenți de întârziere ai soluției, precum parafina; (6) acceleratori ai absorbției, precum compuși de amoniu cuaternar; (7) agenți de umidificare, cum sunt, de exemplu, alcoolul cetilic și monostearatul de glicerol; (8) absorbanti, precum argilă caolin și bentonită; (9) lubrifianti, precum talc, stearat de calciu, stearat de magneziu, polietilen glicoli solizi, laurilsulfat de sodiu și amestecuri ale acestora; și (10) coloranți. În cazul capsulelor, tabletelor și pilulelor, compozițiile farmaceutice pot cuprinde de asemenea agenți de tamponare. Compoziții solide de tip similar pot fi utilizate de asemenea ca agenți de umplere în capsule de gelatină umplute cu material moale sau tare, utilizând excipienți precum lactoza sau zaharuri din lapte, cât și polietilen glicoli cu greutate moleculară mare și asemănătoare.

Formele lichide de dozare pentru administrarea orală includ emulsii, microemulsii, soluții, suspensii, siropuri și elixire acceptabile farmaceutic. În plus față de ingredientul activ, formele lichide de dozare pot conține diluanți inerti utilizați frecvent în domeniu, așa cum sunt apa sau alți solvenți, agenți de solubilizare și emulsifianți, așa cum sunt alcool etilic, alcool izopropilic, carbonat de etil, acetat de etil, alcool benzilic, benzoat de benzil, propilen glicol, 1,3-butilen glicol, uleiuri (în special, uleiuri de semințe de bumbac, arahide, porumb, germeni, măslina, ricin și susan), glicerol, alcool tetrahidrofurilic, polietilen glicoli și esteri ai acizilor grași ai sorbitanului și amestecuri ale acestora. În afară de diluanții inerti, compozițiile orale pot include de asemenea adjuvanți așa cum sunt agenți de umectare, agenți de emulsifiere și de suspendare, agenți de îndulcire, aromare, colorare, parfumare și conservare.

Suspensiile pot conține, în plus față de compușii activi, agenți de suspendare așa cum sunt alcooli de izostearil etoxilat, polioxietilen sorbitol și esteri ai sorbitanului, celuloză microcristalină, metahidroxid de aluminiu, bentonită, agar-agar și tragacant și amestecuri ale acestora.

Compozițiile descrise aici pot conține de asemenea adjuvanți, așa cum sunt conservanți, agenți de umectare, agenți de emulsifiere și agenți de dispersare. Prevenirea acțiunii microorganismelor poate fi asigurată prin includerea diferiților agenți antibacterieni și antifungici, de exemplu, paraben, clorbutanol, fenol, acid sorbic și asemănătoare. Poate fi de asemenea dorit includerea în compoziții a agenților izotonici, așa cum sunt zaharuri, clorură de sodiu și asemănătoare. În plus, poate fi obținută absorbția prelungită a formei farmaceutice injectabile prin includerea agenților care întârzie absorbția, așa cum sunt monostearatul de aluminiu și gelatina.

Se înțelege că regimul de dozare va fi determinat de către mediul curant luând în considerare diferiți factori care modifică acțiunea compușilor subiect descriși aici (de exemplu, polipeptide de fuziune cu T β RII). Diferiții factori includ, dar nu sunt limitați la, vârsta, sexul și dieta pacientului, severitatea

bolii, momentul administrării și alți factori clinici. Opțional, doza poate varia în funcție de tipul de matrice utilizată în reconstituire și de tipurile de compuși din compoziție. Adăugarea în compoziția finală a altor factori de creștere cunoscuți, poate modifica de asemenea doza. Evoluția poate fi urmărită prin evaluarea periodică a creșterii și/sau reparării osoase, de exemplu, raze X (incluzând DEXA), determinări histomorfometrice și marcarea cu tetraciclină.

În unele cazuri, dezvăluirea de față descrie de asemenea terapia genică pentru producerea in vivo a polipeptidelor de fuziune cu TβRII. O astfel de terapie și-ar obține efectul terapeutic prin introducerea secvențelor de polinucleotide TβRII în celule sau țesuturi care au afecțiuni precum cele enumerate mai sus. Furnizarea secvențelor de polinucleotide TβRII poate fi realizată utilizând un vector de exprimare recombinantă așa cum este un virus himeric sau un sistem coloidal de dispersie. Pentru furnizarea terapeutică a secvențelor de polinucleotide TβRII este preferată utilizarea lipozomilor țintiți.

Diferiți vectori virali care pot fi utilizați pentru terapia genică așa cum este învățată aici includ adenovirus, virus herpes, vaccinia sau, preferabil, un virus ARN așa cum este un retrovirus. Preferabil, vectorul retroviral este un derivat dintr-un retrovirus murin sau avian. Exemple de vectori retrovirali în care poate fi inserată o singură genă străină includ, dar nu sunt limitați la: virusul leucemiei murine Moloney (MoMuLV), virusul sarcomului murin Harvey (HaMuSV), virusul tumorii mamare murine (MuMTV) și virusul sarcomului Rous (RSV). Mai mulți vectori retrovirali suplimentari pot încorpora mai multe gene. Toți acești vectori pot transfera sau încorpora o genă pentru un marker selectabil astfel încât pot fi identificate și generate celulele transduse. Pot fi produși vectori retrovirali specifici pentru țintă prin atașarea, de exemplu, unui carbohidrat, glicolipid sau proteină. Țintirea preferată este realizată utilizând un anticorp. Specialistul în domeniu va recunoaște că secvențe de polinucleotide specifice pot fi inserate în genomul retroviral sau atașate la o anvelopă virală pentru a se permite furnizarea specifică pentru țintă a vectorului retroviral care conține polinucleotidul TβRII. Într-un caz preferat, vectorul este ținut la os sau cartilagiu.

Alternativ, celule din cultură de țesut pot fi transfectate direct, prin transfecția convențională cu fosfat de calciu, cu plasmide care codifică genele retrovirale structurale gag, pol și env. Aceste celule sunt transfectate apoi cu plasmida vector care conține genele de interes. Celulele rezultate eliberează vectorul retroviral în mediul de cultură.

Un alt sistem de furnizare ținută pentru polinucleotidele TβRII este un sistem coloidal de dispersie. Sistemele coloidale de dispersie includ complexe macromoleculare, nanocapsule, microsfele, perle și sisteme bazate pe lipide care includ emulsii ulei în apă, miceli, miceli mixte și lipozomi. Sistemul coloidal preferat este un lipozom. Lipozomii sunt vezicule membranare artificiale care sunt utile ca vehicule de furnizare in vitro și in vivo. În interiorul apos pot fi incorporate ARN, ADN și virioni intacti și transportate către celule, într-o formă activă biologic (vezi de exemplu, Fraley, și colab., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Sunt cunoscute în domeniu metode pentru transferul genic eficient prin utilizarea unui vehicul lipozomal, vezi de exemplu, Mannino, și colab., Biotechniques, 6:682, 1988. Compoziția lipozomului este de obicei o combinație de fosfolipide, de obicei în combinație cu steroizi, în special colesterol. Pot fi utilizate de asemenea alte fosfolipide sau alte lipide. Caracteristicile fizice ale lipozomilor depind de pH, tăria ionică și de prezența cationilor divalenți.

Exemple de lipide utile în producerea lipozomilor includ compuși cu fosfatidil, precum fosfatidilglicerol, fosfatidilcolină, fosfatidilserină, fosfatidiletanolamină, sfingolipide, cerebrozide și ganglioze. Fosfolipide exemplificatoare includ dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina și fosfatidilcolina din ou. Este posibilă de asemenea, și cunoscută în domeniu, ținătura lipozomilor pe baza, de exemplu, a specificității pentru organ, specificității pentru celule și specificității pentru organite.

Aici sunt descrise de asemenea formulări care pot fi variate pentru a include acizi și baze pentru corectarea pH-ului; și agenți de tamponare pentru a păstra pH-ul într-un interval îngust.

EXEMPLIFICARE

Fiind acum descrisă în general, dezvăluirea de față va fi mai ușor de înțeles prin referire la următoarele exemple, care sunt incluse doar în scop de ilustrare a anumitor cazuri ale dezvăluirii de față.

Exemplul 1. Generarea variantelor de proteine de fuziune ale receptorului

Variante de ECD al TβRII

Au fost generate proteine de fuziune ale TβRII care cuprind o parte extracelulară solubilă a TβRII uman și o parte de Fc uman. Pentru fiecare proteină de fuziune, o secvență de aminoacizi a TβRII care are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18 a fost fuzionată prin intermediul unuia dintre câțiva

linkeri diferiți la o parte Fc de IgG care are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20. Fiecare dintre proteinele de fuziune a inclus de asemenea o secvență lider de la TPA care are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 23 (mai jos).

5 Activatorul tisular al plasminogenului (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 23)

Un rezumat vizual al câtorva dintre construcții proiectați este furnizat ca Figura 3. Mai jos este furnizat un tabel care detaliază secvențele diferiților construcți testați în secțiunea de Exemplificare:

Numele constructului	Secvența de aminoacizi a constructului	Secvența linkerului
hTβRII-hFc	SEQ ID NO: 9	TGGG (SEQ ID NO: 3)
hTβRII (G4S)2-hFc	SEQ ID NO: 15	TGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4)
hTβRII (G4S)3-hFc	SEQ ID NO: 11	TGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 5)
hTβRII (G4S)4-hFc	SEQ ID NO: 13	TGGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6)
hTβRII balama extinsă-hFc	SEQ ID NO: 17	TGGGPKSCDK (SEQ ID NO: 7)
hTβRII (G4S)5-hFc	SEQ ID NO: 44	TGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 25)
hTβRII (G4S)6-hFc	SEQ ID NO: 45	TGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 26)

10 Mai jos sunt furnizate secvențele de aminoacizi ale componentelor constructului și pentru fiecare dintre construcți, împreună cu secvența de acid nucleic utilizată pentru a exprima acești construcți.

Partea **TβRII:** **Secvență** **de** **aminoacizi**

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF

51 PQLCKFC DVR ESTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCVAV WRKNDENITL

101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI

151 IFSEYNTSN PD (SEQ ID NO: 18)

15 **Partea** **Fc:** **Secvență** **de** **aminoacizi**

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P SREEMTKNQ VSLTCLVKGF

151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV

201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 20)

<i>hTβRII-hFc:</i>	<i>Secvența</i>				<i>acidului</i>	<i>nucleic</i>
1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC	
51	AGTCTTCGTT	TCGCCCCGGC	CCACGATCCC	ACCGCACGTT	CAGAAGTCGG	
101	ATGTGGAAAT	GGAGGCCAG	AAAGATGAAA	TCATCTGCCC	CAGCTGTAAT	
151	AGGACTGCCC	ATCCACTGAG	ACATATTAAT	AACGACATGA	TAGTCACTGA	
201	CAACAACGGT	GCAGTCAAGT	TTCCACAAC	GTGTAAATTT	TGTGATGTGA	
251	GATTTTCCAC	CTGTGACAAC	CAGAAATCCT	GCATGAGCAA	CTGCAGCATC	
301	ACCTCCATCT	GTGAGAAGCC	ACAGGAAGTC	TGTGTGGCTG	TATGGAGAAA	
351	GAATGACGAG	AACATAACAC	TAGAGACAGT	TTGCCATGAC	CCCAAGCTCC	
401	CCTACCATGA	CTTTATTCTG	GAAGATGCTG	CTTCTCCAAA	GTGCATTATG	
451	AAGGAAAAAA	AAAAGCCTGG	TGAGACTTTC	TTCATGTGTT	CCTGTAGCTC	
501	TGATGAGTGC	AATGACAACA	TCATCTTCTC	AGAAGAATAT	AACACCAGCA	
551	ATCCTGACAC	CGGTGGTGGA	ACTCACACAT	GCCCACCGTG	CCCAGCACCT	
601	GAACTCCTGG	GGGGACCGTC	AGTCTTCCTC	TTCCCCCCTC	AACCAAGGA	
651	CACCCTCATG	ATCTCCCGGA	CCCCTGAGGT	CACATGCGTG	GTGGTGGACG	
701	TGAGCCACGA	AGACCCTGAG	GTCAAGTTCA	ACTGGTACGT	GGACGGCGTG	
751	GAGGTGCATA	ATGCCAAGAC	AAAGCCGCGG	GAGGAGCAGT	ACAACAGCAC	
801	GTACCGTGTG	GTCCAGCTCC	TCACCGTCCT	GCACCAGGAC	TGGCTGAATG	
851	GCAAGGAGTA	CAAGTGCAAG	GTCTCCAACA	AAGCCCTCCC	AGCCCCCATC	
901	GAGAAAACCA	TCTCCAAAGC	CAAAGGGCAG	CCCCGAGAAC	CACAGGTGTA	
951	CACCCTGCCC	CCATCCCGGG	AGGAGATGAC	CAAGAACCAG	GTCAGCCTGA	
1001	CCTGCCTGGT	CAAAGGCTTC	TATCCCAGCG	ACATCGCCGT	GGAGTGGGAG	
1051	AGCAATGGGC	AGCCGGAGAA	CAACTACAAG	ACCACGCCTC	CCGTGCTGGA	
1101	CTCCGACGGC	TCCTTCTTCC	TCTATAGCAA	GCTCACCCTG	GACAAGAGCA	
1151	GGTGGCAGCA	GGGGAACGTC	TTCTCATGCT	CCGTGATGCA	TGAGGCTCTG	
1201	CACAACCACT	ACACGCAGAA	GAGCCTCTCC	CTGTCTCCGG	GTAAATGA (SEQ	

ID NO: 8)

<i>hTβRII-hFc:</i>	<i>Secvența</i>				<i>de</i>	<i>aminoacizi</i>
1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN	
51	RTAHPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI	
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKND	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM	
151	KEKKKPGETF	FMCSCSSDEC	NDNIIFSEY	NTSNPDGTTG	THTCPPCPAP	
201	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKENWYVDGV	
251	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	
301	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF	PSREEMTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	
351	SNGQPENNYK	TPPVLDSDG	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVMHEAL	
401	HNHYTQKSL	LSPGK	(SEQ ID NO: 9)			

5

<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)-hFc:</i>				<i>Secvența</i>	<i>acidului</i>	<i>nucleic</i>
1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC		
51	AGTCTTCGTT	TCGCCCCGGC	CCACGATCCC	ACCGCACGTT	CAGAAGTCGG		
101	ATGTGGAAAT	GGAGGCCAG	AAAGATGAAA	TCATCTGCCC	CAGCTGTAAT		
151	AGGACTGCCC	ATCCACTGAG	ACATATTAAT	AACGACATGA	TAGTCACTGA		
201	CAACAACGGT	GCAGTCAAGT	TTCCACAAC	GTGTAAATTT	TGTGATGTGA		

```

251 GATTTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC
301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
351 GAATGACGAG AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC
401 CCTACCATGA CTTTATTCTG GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATTATG
451 AAGGAAAAAA AAAAGCCTGG TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
501 TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC AGAAGAATAT AACACCAGCA
551 ATCCTGACAC CGGTGGTGGA GGAAGTGGTG GAGGTGGTTC TGGAGGTGGT
601 GGAAGTACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCC GCACCTGAAC TCCTGGGGGG
651 ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCCAACCC CAAGGACACC CTCATGATCT
701 CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
751 CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCCTGGAGG TGCATAATGC
801 CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA
851 GCGTCTCTAC CGTCTGACAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
901 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC
951 CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT
1001 CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA
1051 GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC
1101 GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT
1151 TCTTCTCTTA TAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1201 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC
1251 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA (SEQ ID NO: 10)

```

<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)3-hFc:</i>	<i>Secvență</i>	<i>de</i>	<i>aminoacizi</i>	
1	MDAMKRLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN
51	RTAHPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM
151	KEKKKPGETF	FMCSCSSDEC	NDNIIFSEY	NTSNPDTGGG	GSGGGGSGGG
201	GSTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED
251	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
301	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK
351	GFYPDSIAVE	WESNGQPENN	YKTPPVLDLS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG
401	NVFSCSVMEH	ALHNHYTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO: 11)	

5

<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)4-hFc:</i>	<i>Secvență</i>	<i>acidului</i>	<i>nucleic</i>	
1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC
51	AGTCTTCGTT	TCGCCCCGGG	CCACGATCCC	ACCGCACGTT	CAGAAGTCGG
101	ATGTGGAAAT	GGAGGCCAG	AAAGATGAAA	TCATCTGCCC	CAGCTGTAAT
151	AGGACTGCCC	ATCCACTGAG	ACATATTAAT	AACGACATGA	TAGTCACTGA
201	CAACAACGGT	GCAGTCAAGT	TTCCACAAC	GTGTAAATTT	TGTGATGTGA
251	GATTTTCCAC	CTGTGACAAC	CAGAAATCCT	GCATGAGCAA	CTGCAGCATC
301	ACCTCCATCT	GTGAGAAGCC	ACAGGAAGTC	TGTGTGGCTG	TATGGAGAAA
351	GAATGACGAG	AACATAACAC	TAGAGACAGT	TTGCCATGAC	CCCAAGCTCC
401	CCTACCATGA	CTTTATTCTG	GAAGATGCTG	CTTCTCCAAA	GTGCATTATG
451	AAGGAAAAAA	AAAAGCCTGG	TGAGACTTTC	TTCATGTGTT	CCTGTAGCTC
501	TGATGAGTGC	AATGACAACA	TCATCTTCTC	AGAAGAATAT	AACACCAGCA
551	ATCCTGACAC	CGGTGGTGGA	GGTTCTGGAG	GTGGAGGAAG	TGGTGGAGGT
601	GGTTCTGGAG	GTGGTGGGAG	TACTCACACA	TGCCCCACCGT	GCCCAGCACC
651	TGAACTCCTG	GGGGGACCGT	CAGTCTTCCT	CTTCCCCCCA	AAACCCAAGG
701	ACACCCTCAT	GATCTCCCGG	ACCCCTGAGG	TCACATGCGT	GGTGGTGGAC
751	GTGAGCCACG	AAGACCCTGA	GGTCAAGTTC	AACTGGTACG	TGGACGGCGT
801	GGAGGTGCAT	AATGCCAAGA	CAAAGCCGCG	GGAGGAGCAG	TACAACAGCA
851	CGTACCGTGT	GGTCAGCGTC	CTCACCCTCC	TGCACCAGGA	CTGGCTGAAT
901	GGCAAGGAGT	ACAAGTGCAA	GGTCTCCAAC	AAAGCCCTCC	CAGCCCCCAT
951	CGAGAAACCC	ATCTCCAAAG	CCAAAGGGCA	GCCCCGAGAA	CCACAGGTGT
1001	ACACCTTGCC	CCCATCCCCG	GAGGAGATGA	CCAAGAACCA	GGTCAGCCTG
1051	ACCTGCCTGG	TCAAAGGCTT	CTATCCCAGC	GACATCGCCG	TGGAGTGGGA
1101	GAGCAATGGG	CAGCCGGAGA	ACAACTACAA	GACCACGCCT	CCCGTGCTGG
1151	ACTCCGACGG	CTCCTTCTTC	CTCTATAGCA	AGCTCACCGT	GGACAAGAGC
1201	AGGTGGCAGC	AGGGGAACGT	CTTCTCATGC	TCCGTGATGC	ATGAGGCTCT
1251	GCACAACCAC	TACACGCAGA	AGAGCCTCTC	CCTGTCTCCG	GGTAAATGA

10

(SEQ ID NO: 12)

<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)4-hFc:</i>		<i>Secvență</i>	<i>de</i>	<i>aminoacizi</i>
1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN
51	RTAHLPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKEFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM
151	KEKKKPGETF	FMCS CSSDEC	NDNIIFSEY	NTSNPDTGGG	GSGGGGSGGG
201	GSGGGGSTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD
251	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN
301	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	EEMTKNQVSL
351	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS
401	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK (SEQ ID NO: 13)	

<i>hTfIRII</i>	(G4S)4-hFc:	Secvență	de	aminoacizi fără	secvență	lider
1	GATIPPHVQK	SDVEMEAQKD	EIICPSCNRT	AHPLRHINND	MTVTDNNGAV	
51	KFPQLCKFCD	VRFSTCDNQK	SCMSNCSITS	ICEKPQEVCV	AVWRKNDENI	
101	TLETVCHDPK	LPYHDFILED	AASPKCIMKE	KKKPGETFFM	CSCSSDECND	
151	NIIFSEYNT	SNPDTGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSTHTCP	PCPAPELLGG	
201	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCTVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	
251	KTTPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	
301	KAKQPREPQ	VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	
351	ENNYKTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	
401	QKSLSLSPGK	(SEQ ID NO: 50)				

hTfIRII (G4S)4-hFc: Secvență de aminoacizi fără secvență lider și fără glicina dinaintea părții hTβRII

1	ATIPPHVQKS	DVEMEAQKDE	IICPSCNRTA	HPLRHINNDM	IVTDNNGAVK
51	FPQLCKFCDV	RFSTCDNQKS	CMSNCSITSI	CEKPQEVCAV	VWRKNDENIT
101	LETVCHDPKL	PYHDFILED	ASPKCIMKEK	KKPGETFFMC	SCSSDECNDN
151	IIFSEYNTS	NPDTGGGGSG	GGGGSGGGSG	GGGSTHTCPP	CPAPELLGGP
201	SVFLFPPKPK	DTLMISRTP	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK
251	TKPREEQYNS	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK
301	AKQPREPQV	YTLPPSREEM	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE
351	NNYKTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQNVFSCSV	MHEALHNHYT
401	KSLSLSPGK	(SEQ ID NO: 52)			

10 *hTβRII (G4S)4-hFc: Secvență de aminoacizi fără secvență lider și fără glicina și alanina dinaintea părții hTβRII*

1	TIPPHVQKSD	VEMEAQKDEI	ICPSCNRTAH	PLRHINNDMI	VTDNNGAVKF
51	PQLCKFCDVD	FSTCDNQKSC	MSNCSITSIC	EKPQEVCAV	WRKNDENITL
101	ETVCHDPKLP	YHDFILEDAA	SPKCIMKEKK	KPGETFFMCS	CSSDECNDNI
151	IFSEYNTSN	PDGSGGGSGG	GGSGGGSGGG	GGSTHTCPPC	PAPELLGGPS
201	VFLFPPKPKD	DTLMISRTP	TCVVVDVSH	DPEVKFNWY	DGVEVHNAKT
251	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA
301	KGQPREPQV	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPE
351	NYKTPPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQ	GNVFSCSV	MHEALHNHYT
401	SLSLSPGK	(SEQ ID NO: 51)			

15 *hTβRII (G4S)4-hFc: Secvență de aminoacizi fără secvență lider și fără glicina, alanina și treonina dinaintea părții hTβRII*

1	IPPHVQKSDV	EMEAQKDEII	CPSCNRTAHP	LRHINNDMIV	TDNNGAVKFP
51	QLCKFCDVD	STCDNQKSCM	SNCSITSICE	KPQEVCAV	RKNDENITL
101	TVCHDPKLP	HDFILEDAA	PKCIMKEKKK	PGETFFMCSC	SSDECNDNII
151	FSEYNTSNP	DTGGGGSGGG	GSGGGSGGGG	GSTHTCPPCP	APPELLGGPSV
201	FLFPPKPKDT	LMISRTP	CVVVDVSH	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK
251	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK
301	GQPREPQVYT	LPSPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPE
351	YKTPPVLD	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQ	NVFSCSV	MHEALHNHYT
401	LSLSPGK	(SEQ ID NO: 53)			

hTβRII (G4S)4-hFc: Secvență de aminoacizi fără secvență lider și fără glicina, alanina, treonina și izoleucina

<i>izoleucina</i>		<i>dinaintea</i>		<i>părții</i>		<i>hTβRII</i>
1	PPHVQKSDVE	MEAQKDEIIC	PSCNRTAHPL	RHINNDMIVT	DNNGAVKFPQ	
51	LCKFCDVRF	TCDNQKSCMS	NCSITSICEK	PQEVCVAVWR	KNDENITLET	
101	VCHDPKLPYH	DFILEDAAASP	KCIMKEKKKP	GETFFMCSCS	SDECNDNIIF	
151	SEYNTSNPD	TGGGSGGGG	SGGGSGGGG	STHTCPPCPA	PELLGGPSVF	
201	LEFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSHEDP	EVKENWYVDG	VEVHNAKTKP	
251	REEQYNSTYR	VSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKALPAP	IEKTISKAKG	
301	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	
351	KTPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	
401	SLSPGK (SEQ ID NO: 54)					

5 *hTβRII (G4S)4-hFc: Secvență de aminoacizi fără secvență lider și fără glicina, alanina, treonina, izoleucina și*

		<i>prolina</i>	<i>dinaintea</i>	<i>părții</i>	<i>hTβRII</i>
1	PHVQKSDVEM	EAQKDEIICP	SCNRTAHPLR	HINNDMIVTD	NNGAVKFPQL
51	CKFCDVRFST	CDNQKSCMSN	CSITSICEKP	QEVAVVWRK	NDENITLETV
101	CHDPKLPYHD	FILEDAASPK	CIMKEKKKPG	ETFFMCSCSS	DECNDNIIFS
151	EEYNTSNPDT	GGGSGGGGS	GGGSGGGGS	THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL
201	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR
251	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ
301	PREPQVYTLP	PSREEMTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK
351	TTPPVLDSDG	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVMHEAL	HNHYTQKSLS
401	LSPGK (SEQ ID NO: 55)				

10 *hTβRII (G4S)4-hFc: Secvență de aminoacizi fără secvență lider și fără glicina, alanina, treonina, izoleucina, prolina și*

		<i>prolina</i>	<i>dinaintea</i>	<i>părții</i>	<i>hTβRII</i>
1	HVQKSDVEME	AQKDEIICPS	CNRTAHPLRH	INNDMIVTDN	NGAVKFPQLC
51	KFCDVRFSTC	DNQKSCMSNC	SITSICEKPQ	EVCVAVWRKN	DENITLETVC
101	HDPKLPYHDF	ILEDAAAPKC	IMKEKKKPGE	TFMCSCSSD	ECNDNIIFSE
151	EYNTSNPD TG	GGGSGGGSG	GGGSGGGST	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF
201	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE
251	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP
301	REPQVYTLPP	SREEMTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT
351	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTV	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL
401	SPGK (SEQ ID NO: 56)				

<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)2-hFc:</i>		<i>Secvența</i>	<i>acidului</i>	<i>nucleic</i>
1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC
51	AGTCTTCGTT	TCGCCCCGGC	CCACGATCCC	ACCGCACGTT	CAGAAGTCGG
101	ATGTGGAAAT	GGAGGCCAG	AAAGATGAAA	TCATCTGCCC	CAGCTGTAAT
151	AGGACTGCCC	ATCCACTGAG	ACATATTAAT	AACGACATGA	TAGTCACTGA
201	CAACAACGGT	GCAGTCAAGT	TTCCACAAC	GTGTAAATTT	TGTGATGTGA
251	GATTTTCCAC	CTGTGACAAC	CAGAAATCCT	GCATGAGCAA	CTGCAGCATC
301	ACCTCCATCT	GTGAGAAGCC	ACAGGAAGTC	TGTGTGGCTG	TATGGAGAAA
351	GAATGACGAG	AACATAACAC	TAGAGACAGT	TTGCCATGAC	CCCCAAGCTCC
401	CCTACCATGA	CTTTATTCTG	GAAGATGCTG	CTTCTCCAAA	GTGCATTATG
451	AAGGAAAAAA	AAAAGCCTGG	TGAGACTTTC	TTCATGTGTT	CCTGTAGCTC
501	TGATGAGTGC	AATGACAACA	TCATCTTCTC	AGAAGAATAT	AACACCAGCA
551	ATCCTGACAC	CGGTGGAGGT	GGTTCTGGAG	GTGGTGGAAG	TACTCACACA
601	TGCCCCACGT	GCCCAGCACC	TGAACTCCTG	GGGGGACCGT	CAGTCTTCCT
651	CTTCCCCCCA	AAACCAAGG	ACACCCTCAT	GATCTCCCGG	ACCCCTGAGG
701	TCACATGCGT	GGTGGTGGAC	GTGAGCCACG	AAGACCCTGA	GGTCAAGTTC
751	AACTGGTACG	TGGACGGCGT	GGAGGTGCAT	AATGCCAAGA	CAAAGCCGCG
801	GGAGGAGCAG	TACAACAGCA	CGTACCGTGT	GGTCAGCGTC	CTCACCGTCC
851	TGCACCAGGA	CTGGCTGAAT	GGCAAGGAGT	ACAAGTGCAA	GGTCTCCAAC
901	AAAGCCCTCC	CAGCCCCCAT	CGAGAAAACC	ATCTCCAAAAG	CCAAAGGGCA
951	GCCCCGAGAA	CCACAGGTGT	ACACCCTGCC	CCCATCCCGG	GAGGAGATGA
1001	CCAAGAACCA	GGTCAGCCTG	ACCTGCCTGG	TCAAAGGCTT	CTATCCCAGC
1051	GACATCGCCG	TGGAGTGGGA	GAGCAATGGG	CAGCCGGAGA	ACAACCTACAA
1101	GACCACGCCT	CCCGTGCTGG	ACTCCGACGG	CTCCTTCTTC	CTCTATAGCA
1151	AGCTCACCGT	GGACAAGAGC	AGGTGGCAGC	AGGGGAACGT	CTTCTCATGC
1201	TCCGTGATGC	ATGAGGCTCT	GCACAACCAC	TACACGCAGA	AGAGCCTCTC
1251	CCTGTCTCCG	GGTAAATGA	(SEQ ID NO: 14)		

5	<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)2-hFc:</i>	<i>Secvența</i>	<i>de</i>	<i>aminoacizi</i>
1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN
51	RTAHPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM
151	KEKKKPGETF	FMCSCSSDEC	NDNIIFSEY	NTSNPDITGGG	GSGGGGSTHT
201	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
251	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN
301	KALPAPIEKT	ISKAKQPRE	PQVYTLPPSR	EEMTKNQVSL	TCLVKGFYPS
351	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC
401	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK (SEQ ID NO: 15)		

<i>hTβRII</i>	<i>balama</i>	<i>extinsă-hFc:</i>	<i>Secvența</i>	<i>acidului</i>	<i>nucleic</i>
1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC
51	AGTCTTCGTT	TCGCCCCGCG	CCACGATCCC	ACCGCACGTT	CAGAAGTCGG
101	ATGTGGAAT	GGAGGCCAG	AAAGATGAAA	TCATCTGCCC	CAGCTGTAAT
151	AGGACTGCCC	ATCCACTGAG	ACATATTAAT	AACGACATGA	TAGTCACTGA
201	CAACAACGGT	GCAGTCAAAGT	TTCCACAAC	GTGTAAATTT	TGTGATGTGA
251	GATTTTCCAC	CTGTGACAAC	CAGAAATCCT	GCATGAGCAA	CTGCAGCATC
301	ACCTCCATCT	GTGAGAAGCC	ACAGGAAGTC	TGTGTGGCTG	TATGGAGAAA
351	GAATGACGAG	AACATAACAC	TAGAGACAGT	TTGCCATGAC	CCCAAGCTCC
401	CCTACCATGA	CTTTATTCTG	GAAGATGCTG	CTTCTCCAAA	GTGCATTATG
451	AAGGAAAAAA	AAAAGCCTGG	TGAGACTTTC	TTCATGTGTT	CCTGTAGCTC
501	TGATGAGTGC	AATGACAACA	TCATCTTCTC	AGAAGAATAT	AACACCAGCA
551	ATCCTGACAC	CGGTGGTGGG	CCCAAATCTT	GTGACAAAAC	TCACACATGC
601	CCACCGTGCC	CAGCACCTGA	ACTCCTGGGG	GGACCGTCAG	TCTTCCTCTT
651	CCCCCAAAA	CCCAAGGACA	CCCTCATGAT	CTCCCGGACC	CCTGAGGTCA
701	CATGCGTGGT	GGTGGACGTG	AGCCACGAAG	ACCCTGAGGT	CAAGTTCAAC
751	TGGTACGTGG	ACGGCGTGGG	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA
801	GGAGCAGTAC	AACAGCACGT	ACCGTGTGGT	CAGCGTCCTC	ACCGTCCTGC
851	ACCAGGACTG	GCTGAATGGC	AAGGAGTACA	AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA
901	GCCCTCCAG	CCCCATCGA	GAAAACCATC	TCCAAAGCCA	AAGGGCAGCC
951	CCGAGAACCA	CAGGTGTACA	CCCTGCCCCC	ATCCCGGGAG	GAGATGACCA
1001	AGAACCAGGT	CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	TCCCAGCGAC
1051	ATCGCCGTGG	AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	CCGGAGAACAA	ACTACAAGAC
1101	CACGCCTCCC	GTGCTGGACT	CCGACGGCTC	CTTCTTCCTC	TATAGCAAGC
1151	TCACCGTGGG	CAAGAGCAGG	TGGCAGCAGG	GGAACGTCTT	CTCATGCTCC
1201	GTGATGCATG	AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACGCAGAAGA	GCCTCTCCCT
1251	GTCCCCGGGT	AAATGA	(SEQ ID NO: 16)		

5	<i>hTβRII</i>	<i>balama</i>	<i>extinsă-hFc:</i>	<i>Secvența</i>	<i>de</i>	<i>aminoacizi</i>
1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN	
51	RTAHPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI	
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM	
151	KEKKKPGETF	FMSCSSDEC	NDNIIFSEY	NTSNPDTGGG	PKSCDKTHTC	
201	PPCPAPELLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	
251	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	
301	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP	QVYTLPPSRE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	
351	IAVEWESNGQ	PENNYKTTPP	VLDSDGSFFL	YSKLTVDKSR	WQQGNVFCSS	
401	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	K	(SEQ ID NO: 17)		

<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)5-hFc:</i>		<i>Secvența</i>		<i>de</i>	<i>aminoacizi</i>
1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN	
51	RTAHLPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI	
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM	
151	KEKKKPGETF	FMCSCSSDEC	NDNIIFSEY	NTSNPDTGGG	GSGGGGSGGG	
201	GSGGGGSGGG	GSTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	
251	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	
301	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	
351	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTPPVLD	DGSFFLYSKL	
401	TVDKSRWQQG	NVFCSSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO: 44)	

10

<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)6-hFc:</i>		<i>Secvența</i>	<i>de</i>	<i>aminoacizi</i>
1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN
51	RTAHPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM
151	KEKKKPGETF	FMCSSSDEC	NDNIIFSEY	NTSNPDTGGG	GSGGGGSGGG
201	GSGGGGSGGG	GSGGGGSTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR
251	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV
301	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR
351	EEMTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTP	PVLDSDGSFF
401	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK (SEQ ID
NO: 45)					

<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)5-hFc: Secvență</i>					de	nucleotide
1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC		
51	AGTCTTCGTT	TCGCCCCGGCG	CCACGATCCC	ACCGCACGTT	CAGAAGTCGG		
101	ATGTGGAAAT	GGAGGCCAG	AAAGATGAAA	TCATCTGCCC	CAGCTGTAAT		
151	AGGACTGCCC	ATCCACTGAG	ACATATTAAT	AACGACATGA	TAGTCACTGA		
201	CAACAACGGT	GCAGTCAAGT	ITCCACAACCT	GTGTAAATTT	TGTGATGTGA		
251	GATTTTCCAC	CTGTGACAAC	CAGAAATCCT	GCATGAGCAA	CTGCAGCATC		
301	ACCTCCATCT	GTGAGAAGCC	ACAGGAAGTC	TGTGTGGCTG	TATGGAGAAA		
351	GAATGACGAG	AACATAACAC	TAGAGACAGT	TTGCCATGAC	CCCAAGCTCC		
401	CCTACCATGA	CTTTATTCTG	GAAGATGCTG	CTTCTCCAAA	GTGCATTATG		
451	AAGGAAAAAA	AAAAGCCTGG	TGAGACTTTC	TTCATGTGTT	CCTGTAGCTC		
501	TGATGAGTGC	AATGACAACA	TCATCTTCTC	AGAAGAATAT	AACACCAGCA		
551	ATCCTGACAC	CGGTGGAGGA	GGTTCTGGTG	GTGGAGGTTT	TGGAGGTGGA		
601	GGAAGTGGTG	GAGGTGGTTC	TGGAGGTGGT	GGAAGTACTC	ACACATGCCC		
651	ACCGTGCCCA	GCACCTGAAC	TCCTGGGGGG	ACCGTCAGTC	TTCTCTTCC		
701	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	CCCGGACCCC	TGAGGTCACA		
751	TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG		
801	GTACGTGGAC	GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCGCGGGAGC		
851	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC	CGTGTGGTCA	GCGTCCTCAC	CGTCCCTGAC		
901	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGAGTACAAG	TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC		
951	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA	GGGCAGCCCC		
1001	GAGAACCACA	GGTGTACACC	CTGCCCCCAT	CCCGGGAGGA	GATGACCAAG		
1051	AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	GGCTTCTATC	CCAGCGACAT		
1101	CGCCGTGGAG	TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	GGAGAACAAC	TACAAGACCA		
1151	CGCCTCCCGT	GCTGGACTCC	GACGGCTCCT	TCTTCTCTTA	TAGCAAGCTC		
1201	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	GCAGCAGGGG	AACGTCTTCT	CATGCTCCGT		
1251	GATGCATGAG	GCTCTGCACA	ACCACTACAC	GCAGAAGAGC	CTCTCCCTGT		
1301	CTCCGGGTAA	ATGA	(SEQ ID NO: 46)				

5	<i>hTβRII</i>	<i>(G4S)6-hFc: Secvență</i>					de	nucleotide
	1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC		
	51	AGTCTTCGTT	TCGCCCCGGCG	CCACGATCCC	ACCGCACGTT	CAGAAGTCGG		
	101	ATGTGGAAAT	GGAGGCCAG	AAAGATGAAA	TCATCTGCCC	CAGCTGTAAT		
	151	AGGACTGCCC	ATCCACTGAG	ACATATTAAT	AACGACATGA	TAGTCACTGA		
	201	CAACAACGGT	GCAGTCAAGT	ITCCACAACCT	GTGTAAATTT	TGTGATGTGA		
	251	GATTTTCCAC	CTGTGACAAC	CAGAAATCCT	GCATGAGCAA	CTGCAGCATC		
	301	ACCTCCATCT	GTGAGAAGCC	ACAGGAAGTC	TGTGTGGCTG	TATGGAGAAA		
	351	GAATGACGAG	AACATAACAC	TAGAGACAGT	TTGCCATGAC	CCCAAGCTCC		
	401	CCTACCATGA	CTTTATTCTG	GAAGATGCTG	CTTCTCCAAA	GTGCATTATG		
	451	AAGGAAAAAA	AAAAGCCTGG	TGAGACTTTC	TTCATGTGTT	CCTGTAGCTC		
	501	TGATGAGTGC	AATGACAACA	TCATCTTCTC	AGAAGAATAT	AACACCAGCA		
	551	ATCCTGACAC	CGGTGGAGGT	GGAAGTGGTG	GAGGAGGTTT	TGGTGGTGGGA		
	601	GGTTCTGGAG	GTGGAGGAAG	TGGTGGAGGT	GGTTCTGGAG	GTGGTGGGAAG		
	651	TACTCACACA	TGCCCACCGT	GCCCAGCACC	TGAATCTCTG	GGGGGACCGT		
	701	CAGTCTTCCT	CTTCCCCCCA	AAACCCAAGG	ACACCTCAT	GATCTCCCGG		
	751	ACCCCTGAGG	TCACATGCGT	GGTGGTGGAC	GTGAGCCACG	AAGACCCTGA		
	801	GGTCAAGTTC	AACTGGTACG	TGGACGGCGT	GGAGGTGCAT	AATGCCAAGA		
	851	CAAAGCCGCG	GGAGGAGCAG	TACAACAGCA	CGTACCGTGT	GGTCAGCGTC		
	901	CTCACCGTCC	TGCACCAGGA	CTGGCTGAAT	GGCAAGGAGT	ACAAGTGCAA		
	951	GGTCTCCAAC	AAAGCCCTCC	CAGCCCCCAT	CGAGAAAACC	ATCTCCAAG		
	1001	CCAAAGGGCA	GCCCCGAGAA	CCACAGGTGT	ACACCTTGCC	CCCATCCCGG		
	1051	GAGGAGATGA	CCAAGAACCA	GGTCAGCCTG	ACCTGCCTGG	TCAAAGGCTT		
	1101	CTATCCCAGC	GACATCGCCG	TGGAGTGGGA	GAGCAATGGG	CAGCCGGAGA		
	1151	ACAACCTACAA	GACCACGCCT	CCCGTGCTGG	ACTCCGACGG	CTCCTTCTTC		
	1201	CTCTATAGCA	AGCTCACCGT	GGACAAGAGC	AGGTGGCAGC	AGGGGAACGT		
	1251	CTTCTCATGC	TCCGTGATGC	ATGAGGCTCT	GCACAACCAC	TACACGCAGA		
	1301	AGAGCCTCTC	CCTGTCTCCG	GGTAAATGA	(SEQ ID NO: 47)			

Diferenții construcții au fost exprimați cu succes în celule CHO și au fost purificați la un nivel înalt de puritate așa cum este determinat de cromatografia analitică cu excludere prin dimensiune și SDS-PAGE. Proteinele hTβRII (G4S)2-hFc, hTβRII (G4S)3-hFc, hTβRII (G4S)4-hFc, hTβRII (G4S)5-hFc și hTβRII (G4S)6-hFc au prezentat o stabilitate puternică similară așa cum a fost determinat prin analiza

SDS-PAGE după păstrarea în PBS timp de 13 zile la 37°C. Proteinele hTβRII (G4S)2-hFc, hTβRII (G4S)3-hFc, hTβRII (G4S)4-hFc s-au păstrat de asemenea în șobolan, șoarece sau ser uman și au prezentat o stabilitate puternică similară.

5 Variante de ECD al TβRII

În plus față de domeniile TβRII incluse în proteinele de fuziune descrise mai sus (de exemplu, SEQ ID NO: 18), dezvăluirea consideră de asemenea proteine de fuziune care cuprind domenii TβRII alternative. De exemplu, proteina de fuziune poate cuprinde secvența hTβRII_{scurt} de tip sălbatic (23-159) prezentată mai jos (SEQ ID NO: 27) sau oricare dintre celelalte polipeptide TβRII dezvăluite mai jos:

```
1  TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51  ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPD (SEQ ID NO:
27)
```

(1) Secvența de aminoacizi hTβRII_{scurt}(23-159/D110K) prezentată mai jos (SEQ ID NO: 36), în care este subliniat restul substituit.

```
1  TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51  ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHKFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPD (SEQ ID NO:
36)
```

(2) Secvența de aminoacizi a hTβRII_{scurt}(29-159) trunchiat N-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 28).

```
1  QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
51  KPQEVVCVAVW RKNDENITLE TVCHDPKLPY HDFILEDAAAS PKCIMKEKKK
101 PGETFFMCSC SSDECNDNII FSEEYNTSNP D (SEQ ID NO: 28)
```

(3) Secvența de aminoacizi a hTβRII_{scurt}(35-159) trunchiat N-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 29).

```
1  DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV
51  VAVWRKNDEN ITLETVCHDP KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF
101 MCS CSSDECN DNIIFSEEYN TSNPD (SEQ ID NO: 29)
```

(4) Secvența de aminoacizi a hTβRII_{scurt}(23-153) trunchiat C-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 30).

```
1  TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51  ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE Y (SEQ ID NO: 30)
```

(5) Secvența de aminoacizi a hTβRII_{scurt}(23-153/N70D) trunchiat C-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 38), în care este subliniat restul substituit.

```
1  TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSDCS
51  ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE Y (SEQ ID NO: 38)
```

Solicitanții consideră de asemenea cinci variante corespondente (SEQ ID NO: 37, 33, 34, 39) bazate pe secvența hTβRII_{lung} de tip sălbatic (23-184) prezentată mai sus și mai jos (SEQ ID NO: 49), în care este subliniat insertul de 25 de aminoacizi. De remarcat că splicingul duce la o substituție conservativă de aminoacid (Val→Ile) în poziția de flancare C-terminal de insert.

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAVAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEYNTSN PD (SEQ ID NO: 49)

(1) Secvența de aminoacizi hTβRII_{lung}(23-184/D135K) prezentată mai jos (SEQ ID NO: 37), în care restul substituit este subliniat dublu.

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAVAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHKFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 5 151 IFSEYNTSN PD (SEQ ID NO: 37)

(2) Secvența de aminoacizi hTβRII_{lung}(29-184) trunchiat N-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 33).

1 QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN RTAHPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF
 51 CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI TSICEKPQEV CVAVWRKNDE NITLETVCHD
 101 PKLPYHDFIL EDAASPKCIM KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSEY
 151 NTSNPD (SEQ ID NO: 33)

10 (3) Secvența de aminoacizi hTβRII_{lung}(60-184) trunchiat N-terminal prezentată mai jos (la fel ca SEQ ID NO: 29).

1 DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV
 51 VAVWRKNDE NITLETVCHD KLPYHDFIL EDAASPKCIM KEKKKPGETF
 101 MCSCSSDEC NDNIIFSEYN TSNPD (same as SEQ ID NO: 29)

(4) Secvența de aminoacizi hTβRII_{lung}(23-178) trunchiat C-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 34).

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAVAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 15 151 IFSEY (SEQ ID NO: 34)

(5) Secvența de aminoacizi hTβRII_{lung}(23-178/N95D) trunchiat C-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 39), în care restul substituit este subliniat dublu.

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSDCSITSIC EKPQEVCAVAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 15 151 IFSEY (SEQ ID NO: 39)

20

Variante suplimentare ale ECD de TβRII includ:

(A) Secvența de aminoacizi hTβRII_{scurt}(35-153) sau hTβRII_{lung}(60-178) trunchiată N- și C-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 32).

1 DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV
 51 VAVWRKNDE NITLETVCHD KLPYHDFILE EDAASPKCIM KEKKKPGETF
 25 101 MCSCSSDEC NDNIIFSEY (SEQ ID NO: 32)

(B) Secvența de aminoacizi hTβRII_{scurt}(29-153) trunchiată N- și C-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 31).

1 QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
 51 KPQEVCVAVW RKNDENITLE TVCHDPKLPY HDFILEDAAS PKCIMKEKKK
 101 PGETFFMCSC SSDECNDNII FSEFY (SEQ ID NO: 31)

(C) Secvența de aminoacizi hTβRII_{lung}(29-178) trunchiată N- și C-terminal prezentată mai jos (SEQ ID NO: 35).

5 1 QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN RTAHPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF
 51 CDVRFSTCDN QKSCMSNCIS TSICEKPQEV CVAVWRKND NITLETVCHD
 101 PKLPYHDFIL EDAASPKCIM KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSEFY
 (SEQ ID NO: 35)

10 Oricare dintre variantele de mai sus (SEQ ID NO: 36, 28, 29, 30, 38, 37, 33, 34, 39, 32, 31 și 35) ar putea incorpora o inserție de 36 de aminoacizi (SEQ ID NO: 41) între perechea de resturi de glutamat (pozițiile 151 și 152 din SEQ ID NO: 1, sau pozițiile 176 și 177 din SEQ ID NO: 2) localizată în apropierea capătului C-terminal al ECD hTβRII, așa cum apare în mod natural în izoforma C a hTβRII (Konrad și colab., BMC Genomics 8:318, 2007).

GRCKIRHIGS NNRLQRSTCQ NTGWESAHVM KTPGFR (SEQ ID NO: 41)

15 Ca exemplu, resturile pereche de glutamat care flanchează situsul opțional de inserție sunt indicate (subliniate) mai jos pentru varianta hTβRII_{scurt}(29-159) (SEQ ID NO: 28).

1 QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
 51 KPQEVCVAVW RKNDENITLE TVCHDPKLPY HDFILEDAAS PKCIMKEKKK
 101 PGETFFMCSC SSDECNDNII FSEFYNTSNP D (SEQ ID NO: 28)

Variante ale domeniului Fc

20 În timp ce construcții descriși mai sus au fost generați cu un domeniu Fc care are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20, dezvăluirea consideră proteine de fuziune hTβRII-hFc care cuprind domenii Fc alternative, incluzând un domeniu Fc de IgG2 umană (SEQ ID NO: 42, mai jos) sau Fc de IgG1 de lungime integrală (hG1Fc) (SEQ ID NO: 43, mai jos). Opțional, în locul domeniului Fc ar putea fi atașată o polipeptidă neînrudită unui domeniu Fc.

25 1 VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
 51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
 101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 151 SDIAVEWESN GPENNYKTT PPM L DSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 201 CSV MHEALHN HYTQKSL SLS PGK (SEQ ID NO: 42)
 1 GGPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV
 51 DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL
 101 NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS
 151 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVL DSDGSF FLYSKLTVDK
 201 SRWQQGNVFS CSV MHEALHN HYTQKSL SLS PGK (SEQ ID NO: 43)

Variante ale secvenței lider

30 În timp ce construcții generați descriși mai sus au inclus secvența lider de la TPA, pot fi utilizate secvențe lider alternative, așa cum este secvența lider nativă (SEQ ID NO: 22- mai jos) sau secvența lider de la melitina de la albine (SEQ ID NO: 24- mai jos).

Nativă: MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIAS (SEQ ID NO: 22)

melitina de la albine (HBML): MKFLVNVALVEMWYISYIYA (SEQ ID NO: 24)

35

Exemplul 2. Inhibarea diferențială a liganzilor de către variante de proteine de fuziune a receptorului în analize bazate pe celule

Afinitățile TGFβ1, TGFβ2 și TGFβ3 pentru proteine hTβRII (G4S)2-hFc; hTβRII (G4S)3-hFc; hTβRII (G4S)4-hFc; hTβRII-hFc și hTβRII balama extinsă-hFc au fost evaluate in vitro cu un instrument Biacore™ și rezultatele sunt rezumate în Figurile 4A și 4B. Fiecare dintre proteinele de fuziune a fost capabilă să lege TGFβ1 și TGFβ3 cu afinitate înaltă, dar construcții care au lungimi ale linkerului mai mari sau egale cu (G4S)4 au fost capabili în mod surprinzător să lege ambele TGFβ1 și TGFβ3 cu afinitate mai înaltă decât construcții care au lungimi ale linkerilor mai mici decât (G4S)4. Legarea dintre TGFβ2 și oricare dintre construcții a fost joasă sau trecătoare. Deglicozilarea construcțiilor nu a modificat legarea.

Pentru a se determina capacitatea variantelor de hTβRII-hFc de a inhiba activitatea TGFβ1, TGFβ2 și TGFβ3, a fost utilizată o analiză cu genă reporter în celule A549. Aceasta analiză se bazează pe o linie celulară umană de carcinom pulmonar transfectată cu un plasmid reporter pGL3(CAGA)12 (Dennler și colab., 1998, EMBO 17: 3091-3100) cât și cu un plasmid reporter Renilla (pRLCMV) ca martor pentru eficiența transfecției. Motivul CAGA este prezent în promotorii genelor de răspuns la TGFβ (de exemplu, PAI-1), prin urmare acest vector are utilizare generală pentru factori care semnalizează prin SMAD2 și SMAD3.

În prima zi a analizei, celulele A549 (ATCC®: CCL-185™) au fost distribuite în plăci cu 48 de godeuri. În a doua zi, a fost preincubată o soluție care a conținut pGL3(CAGA)12, pRLCMV, XtremeGENE 9 (Roche Applied Science) și OptiMEM (Invitrogen) și a fost apoi adăugată în mediu minim esențial Eagle (EMEM, ATCC®) suplimentat cu 0,1% BSA, care a fost aplicat peste celulele însămănțate pentru incubarea peste noapte la 37°C, 5% CO₂. În a treia zi, a fost îndepărtat mediul și celulele au fost incubate peste noapte la 37°C, 5% CO₂ cu un amestec de liganzi și inhibitori preparat așa cum este descris mai jos.

Au fost făcute diluții seriate de articole de testat într-o placă cu 48 de godeuri, în soluție tampon de analiză (EMEM + 0,1 % BSA). A fost adăugat un volum egal de soluție tampon de analiză care a conținut ligandul de testat pentru a se obține o concentrație finală de ligand egală cu EC50 determinată anterior. TGFβ1 uman, TGFβ2 uman și TGFβ3 uman au fost obținute de la PeproTech. Soluțiile de testat au fost incubate 30 de minute la 37°C și apoi o parte a amestecului a fost adăugată în toate godeurile. După incubarea peste noapte cu soluții de testat, celulele au fost spălate cu soluție salină tamponată cu fosfat, apoi lizate cu un tampon pasiv de lizare (Promega E1941) și depozitate peste noapte la -70°C. În ziua a patra și ultima, plăcile au fost încălzite la temperatura camerei sub agitare blândă. Lizatele celulare au fost transferate în duplicat într-o placă pentru chemiluminiscență (96 de godeuri) și analizate cu un luminometru, utilizând reactivi dintr-un sistem de analiză cu reporter Dual-Luciferase (Promega E1980) pentru a se determina activitatea normalizată a luciferazei.

Așa cum este reprezentat în Figurile 5A-5F, proteinele hTβRII (G4S)2-hFc; hTβRII (G4S)3-hFc; hTβRII (G4S)4-hFc; hTβRII (G4S)5-hFc; hTβRII (G4S)6-hFc; hTβRII-hFc; și hTβRII balama extinsă-hFc au fost toate capabile să inhibe ambele TGFβ1 și TGFβ3. Interesant, în timp ce a fost o corelație între inhibarea îmbunătățită a TGFβ1 și TGFβ3 și lungimea linkerului pentru construcții HTβRII (G4S)2-hFc; HTβRII (G4S)3-hFc și HTβRII (G4S)4-hFc (Figura 5E), această tendință de îmbunătățire a parut să se plafoneze pentru construcții HTβRII (G4S)5-hFc și HTβRII (G4S)6-hFc (Figura 5F).

În timp ce au fost discutate forme de realizare specifice ale subiectului de față, specificația de mai sus este ilustrativă și nu restrictivă. După recenzarea acestei specificații și revendicărilor de mai jos, specialistului în domeniu îi vor deveni evidente multe variații. Întinderea întreagă a dezvoltării de față ar trebui să fie determinată prin referință la revendicări și la specificație.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-98/48024
- ISAKA, YOSHITAKA et al.: "Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis", *Kidney international*, vol. 55, no. 2, 1999, pages 465-475, XP055546512,
- WO-A1-2014/164427
- YUNG, LAI-MING et al.: "A selective transforming growth factor-beta ligand trap attenuates pulmonary hypertension", *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 194, no. 9, 2016, pages 1140-1151, XP009193771,
- WO-A1-2015/027082
- WO-A1-2016/164501
- WO-A1-2017/024171
- WO-A1-2017/134592
- WO-A1-2018/064190
- WO-A2-2011/109789

(57) Revendicări:

1. Polipeptidă de fuziune a receptorului II pentru factorul de creștere și transformare- β (T β RII) care cuprinde:

a) un domeniu extracelular al unei părți de T β RII care cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90%, 95%, 97%, 99% sau 100% cu SEQ ID NO: 18;

b) o parte heteroloagă, unde partea heteroloagă este un domeniu Fc de imunoglobulină, și

c) o parte linker care cuprinde (GGGGS)_n, unde n = 4, 5 sau 6;

unde domeniul extracelular al părții de T β RII este conectat la partea heteroloagă prin intermediul părții linker; și

unde polipeptida de fuziune leagă factorul de creștere și transformare β 1 (TGF β 1) și factorul de creștere și transformare β 3 (TGF β 3).

2. Polipeptidă conform revendicării 1, în care partea domeniu extracelular al T β RII cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90%, 95% sau 97% cu SEQ ID NO: 18.

3. Polipeptidă conform revendicării 1, în care partea domeniu extracelular al T β RII cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18.

4. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care polipeptida cuprinde o secvență lider N-terminală.

5. Polipeptidă conform revendicării 4, în care secvența lider N-terminală cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 23.

6. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care partea heteroloagă cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90%, 95% sau 97% cu SEQ ID NO: 20.

7. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care partea heteroloagă cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 20.

8. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care linkerul cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 6.

9. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-8, în care polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90% sau 95% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 13, 53 sau 56.

10. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-8, în care polipeptida cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 13, 53 sau 56.

11. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-10, în care polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este identică cel puțin 90%, 95%, 97% sau 99% cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 48.

12. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-11, în care polipeptida cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 48.

13. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-12, unde polipeptida leagă TGFβ1 cu o K_D mai mică de 200 pM, mai mică de 150 pM, mai mică de 100 pM, mai mică de 75 pM, mai mică de 50 pM sau mai mică de 25 pM, și/sau în care polipeptida leagă TGFβ3 cu o K_D mai mică de 75 pM, mai mică de 70 pM, mai mică de 60 pM, mai mică de 50 pM, mai mică de 40 pM, mai mică de 35 pM, mai mică de 25 pM, mai mică de 15, mai mică de 10 sau mai mică de 5 pM.

14. Polipeptidă conform oricăreia dintre revendicările 1-13, unde polipeptida inhibă TGFβ1 cu o IC_{50} mai mică de 0,1 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter, și/sau unde polipeptida inhibă TGFβ3 cu o IC_{50} mai mică de 0,05 nM, așa cum este determinat utilizând o analiză cu genă reporter.

15. Polipeptidă conform revendicării 14, unde analiza cu genă reporter este o analiză cu reporter CAGA.

16. Preparat farmaceutic care cuprinde polipeptida conform oricăreia dintre revendicările 1-15 și un excipient acceptabil farmaceutic.

```

1  mgqgllnglw pihivlvrrl aslppstguk svnmnmvrd ovgavkfpel
51  okfcdvrfet cunqksomen cvlslsckp qorovavwk ndenllclv
101 chdchlpvnd flledsaapt dlmkbbkpg erffacasa deandnlfa
151 seyntanodi livifqvtei silpplqvai wlllfycyr vnrqgklast
201 wetgktrklm efsehcail eddradiast cennichata lplaidtlv
251 gkgrfaevyk alkqataeq fetvavklfp yeryawekte kdlfadlnk
301 kenilqflta eerktelgkq ywlitafhak gnlqeyltrk vlewedlkl
351 qeslarslsh lhedhtpqr; pampichedl keenilvknk ltcclcdfl
401 slrdpqlar ddlanegqvq tarynapavl eamnieave skqtdsryx
451 alvlwester anevgevkdv eppigskvte hpoveamkdn vlrdrgpvl
501 psfwlnhagl qevastllec wdhdppearl agovaerfas lehldrlsq
551 accektped galnttk (SEQ ID NO: 1)

```

FIGURA 1

```

1  mgqgllnglw pihivlvrrl aslppstguk svnmnmvrd ovgavkfpel
51  ehprrhlna mivtdnngar kfpalcrafed vrfetcdngk amonmvlra
101 icnppgrvrv avrkhodeni claryvutgk lryvmlfled saepkclmke
151 kkppgetiffm cacsadecnd niifaseynt apdillivif qvtqivlpp
201 lqvavlvll lvcyrvvurg bleatwetgk tnlmefsen onllcedra
251 dasatcanni mhteltpia ldtlvqkrf aavytaklkq nteeqferve
301 vhlfpyeeya vektakolfs dlnlshenil qlitaeerkt elgqywhlt
351 efhakgnlqe ylarvieve dlxlqssia xqianihedr vpogepkagi
401 vhrdlhaeni lrvnditocl adfglskald plsvodian sqpqtatp
451 apviesarmn lmvssfkq; dvysalvlw eamercnave evkdyepplq
501 skvrebpcve smkdwlvdr qppeipsfvl nhqgigavce tlteredhap
551 earltaqvva erfalehld rlvgrscsse kipedgalnt tk
      (SEQ ID NO: 2)

```

FIGURA 2

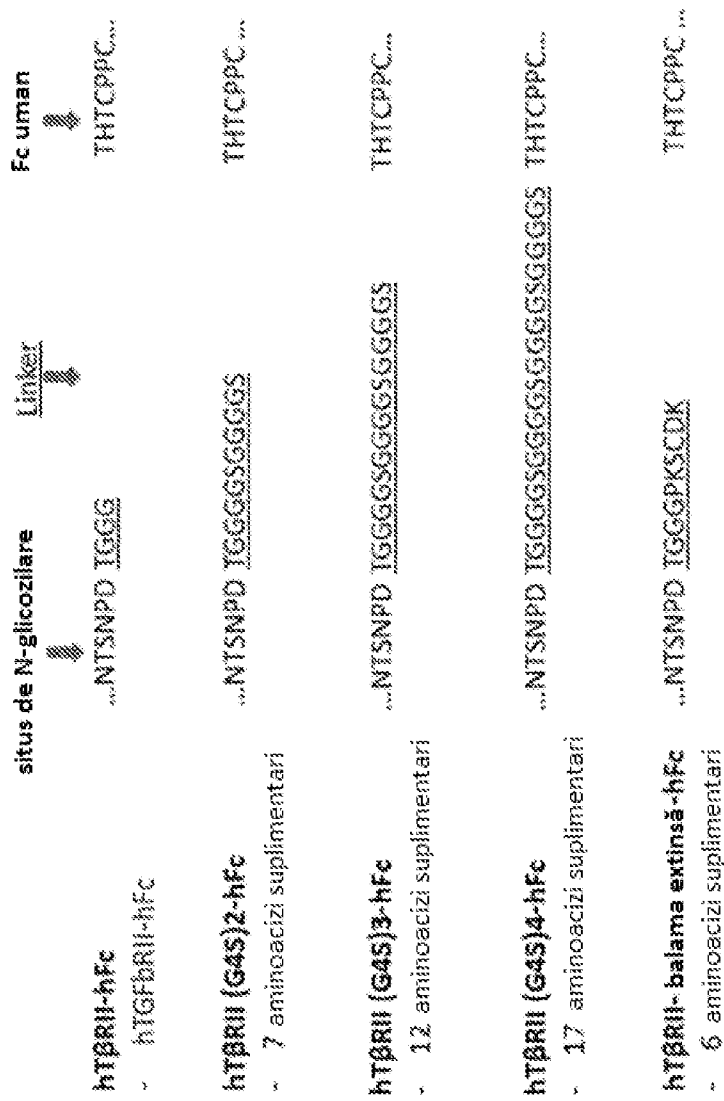


Figura 3

	Proteină de fuziune	k_a (L/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
TGFβ1	hTβRII-hFc	2.01×10^6	4.16×10^{-4}	207,0
	hTβRII (G4S)2-hFc	2.91×10^6	4.83×10^{-4}	165,8
	hTβRII (G4S)3-hFc	3.89×10^6	5.10×10^{-4}	92,4
	hTβRII (G4S)4-hFc	6.69×10^6	4.57×10^{-4}	68,4
	hTβRII-balama extinsă -hFc	2.38×10^6	4.64×10^{-4}	195,5
TGFβ3	hTβRII-hFc	1.99×10^7	1.57×10^{-3}	79,1
	hTβRII (G4S)2-hFc	1.74×10^7	1.81×10^{-3}	104,1
	hTβRII (G4S)3-hFc	2.09×10^7	8.32×10^{-4}	39,9
	hTβRII (G4S)4-hFc	8.80×10^5	2.76×10^{-4}	31,4
	hTβRII-balama extinsă-hFc	1.51×10^7	1.39×10^{-3}	92,1

TGFβ1

Receptor	TGFβ1		
	K_d (1.8M)	K_d (1.6)	K_d (pM)
hTβRII (G4S)5-hFc	7.36×10^7	6.48×10^7	8.8
hTβRII (G4S)6-hFc	1.66×10^8	6.32×10^7	3.8

Receptor	TGFβ3		
	K_d (1.1M)	K_d (1.1)	K_d (pM)
hTβRII (G4S)5-hFc	1.47×10^8	4.35×10^7	2.98
hTβRII (G4S)6-hFc	5.99×10^7	2.78×10^7	4.68

Figura 4B

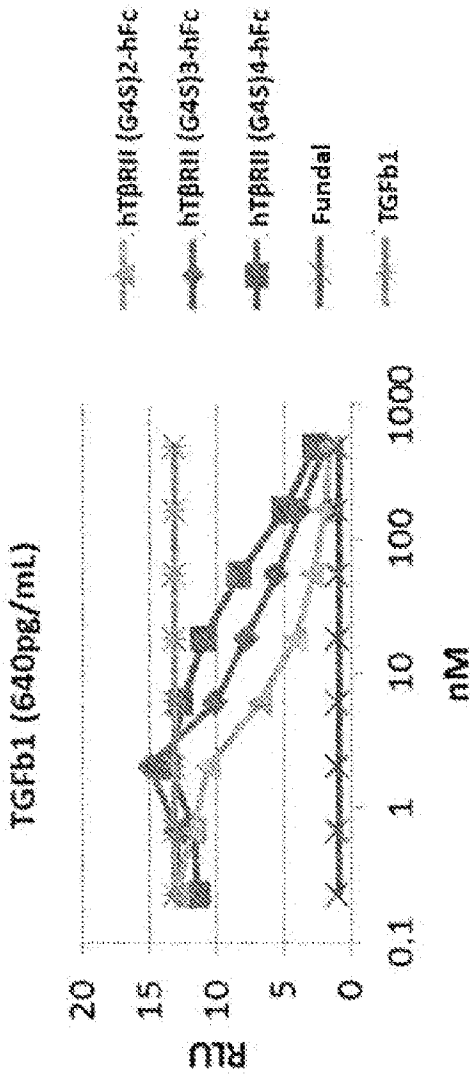


Figura 5A

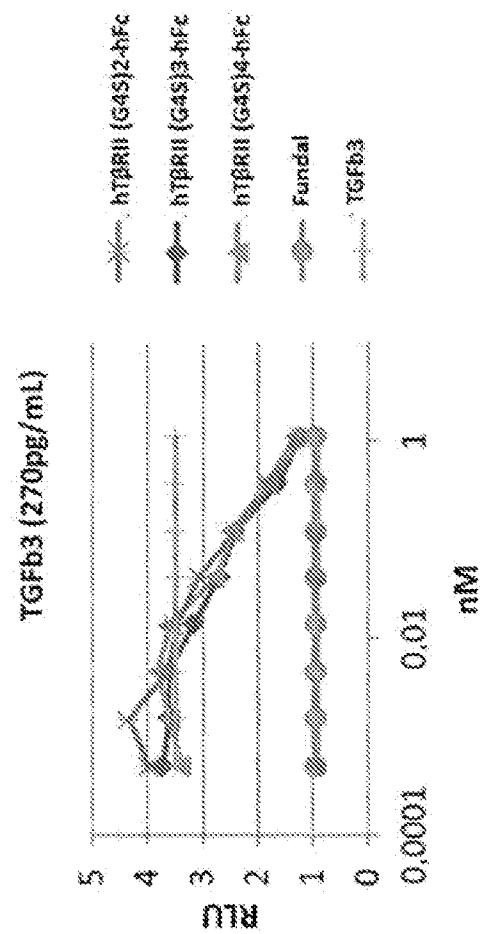


Figura 5B

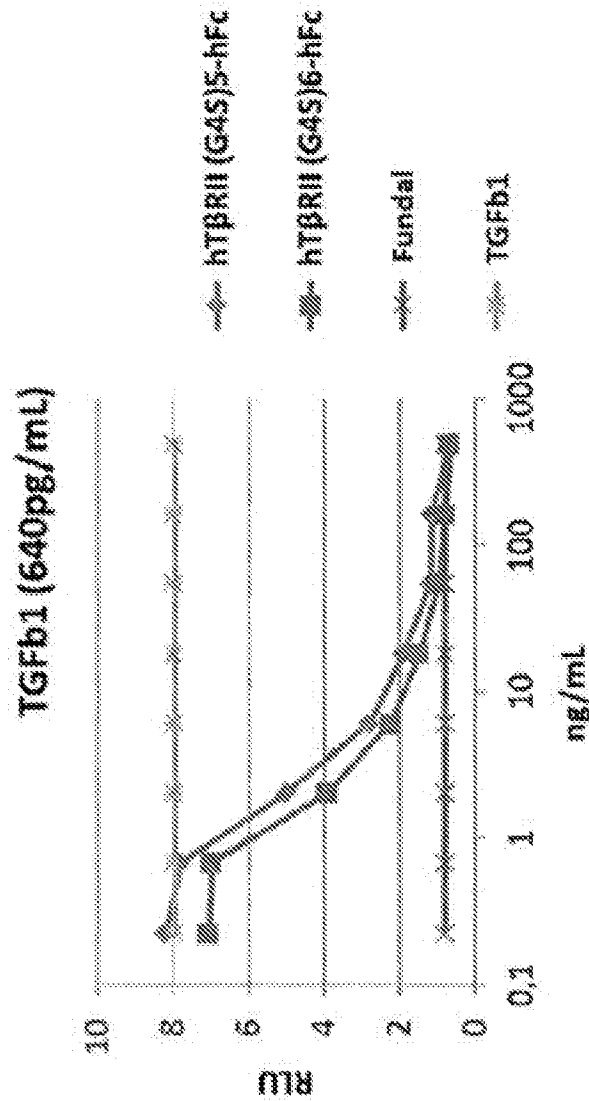


Figura SC

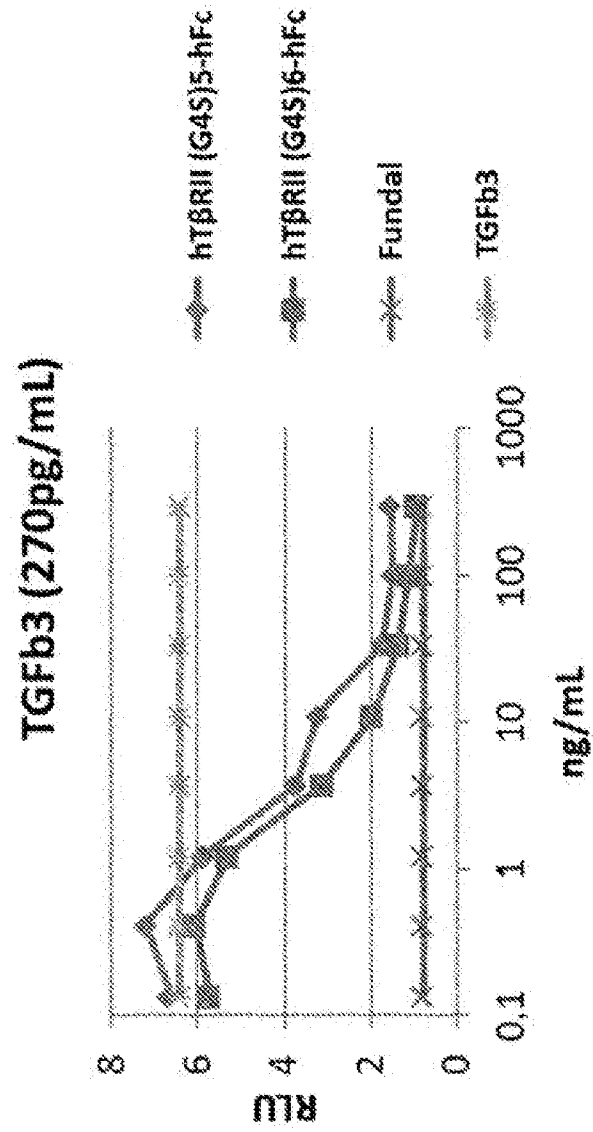


Figura 5D

IC ₅₀ (nM)			
	TGFβ1		
	TGFβ3		
	Raport TGFβ1/TGFβ3		
hTβRII-hFc	7,69	0,18	42
hTβRII (G4S)2-hFc	1,12	0,13	8,61
hTβRII (G4S)3-hFc	0,22	0,17	1,29
hTβRII (G4S)4-hFc	0,07	0,03	2,3
hTβRII balama extinsă-hFc	5,67	0,11	52

Figura 5E

Construct	TGF β 1-IC50 (nM)	TGF β 3-IC50 (nM)	Report TGF β 1/ TGF β 3
hTGF β 1(G4S)S-hFc	0.03	0.04	0.75
hTGF β 1(G4S)G-hFc	0.02	0.04	0.5

Figura 5F